

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Kati Hiieleek

**DNA koopiaarvu muutused primaarse munasarjade  
puudulikkusega naistel**

Magistritöö

Juhendaja prof. Ants Kurg, Ph.D

TARTU 2013

# Sisukord

<b>LÜHENDID JA MÕISTED</b> .....	4
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	6
<b>1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	7
1.1. Primaarne munasarjade puudulikkus .....	7
1.1.1 POI tagajärjed.....	7
1.1.2 Mehhanismid, mis viivad munarakkude reservi enneaegse kahjustumiseni.....	8
1.1.3 POI diagnostika .....	9
1.1.4 POI etioloogia .....	9
1.2 POI geneetilised põhjused .....	10
1.2.1 X-kromosoomi defektid .....	10
1.2.1.1 Turneri sündroom .....	10
1.2.1.2 X-kromosoomi trisoomia.....	11
1.2.1.3 X-kromosoomi ümberkorraldused ja POI .....	11
1.2.2 POI-ga seotud geenid X-kromosoomil.....	12
1.2.2.1 <i>FMRI</i> geen .....	12
1.2.2.2 <i>BMP-15</i> .....	13
1.2.2.3 Teised potentsiaalsed POI tekkega seotud geenid X-kromosoomil .....	15
1.2.3 POI-ga seotud geenid autosoomidel.....	16
1.2.3.1 <i>GDF-9</i> .....	16
1.2.3.2 <i>FOXL2</i> .....	16
1.2.3.3 Folliikuleid stimuleeriv hormoon ja luteiniseeriv hormoon .....	17
1.2.3.4 Inhibiin.....	17
1.2.3.5 Teised potentsiaalsed POI tekkega seotud geenid autosoomidel .....	18
1.2.3.6 Ülegenoomsed uuringud .....	19
1.3 Metaboolsed haigused POI tekkepõhjusena – galaktoseemia .....	19
1.4 Autoimmuunhaigused POI tekkepõhjusena .....	20
1.5 Iatogeensed POI tekkepõhjused .....	21
1.6 Viirushaigused POI tekkepõhjusena.....	22
1.7 Toksiinid ja muud keskkonna ning elustiili faktorid POI tekkepõhjusena.....	22
<b>2 EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	24
2.1 Materjal ja meetodika .....	25

2.1.1	Uuritud patsientide fenotüübid .....	25
2.1.2	Mikrokiibianalüüs .....	26
2.1.2.1	Genotüpiseerimistulemuste analüüs .....	26
2.1.3	Tulemuste kinnitamine reaalaaja kvantitatiivsel PCR meetodil .....	27
2.1.4	LOH alades leitud POI-ga seotud geenide sekveneerimine .....	28
2.1.4.1	Polümeraasi ahelreaktsioon .....	28
2.1.4.2	Sekveneerimine .....	29
2.1.4.3	Andmete analüüs .....	29
2.2	Tulemused .....	30
2.2.1	Genotüpiseerimistulemused .....	30
2.2.1.1	Koopiaarvu variatsioonid .....	30
2.2.1.2	Heterosügootsuse kaotanud alad .....	32
2.2.2	Sekveneerimistulemused .....	32
<b>ARUTELU</b> .....		33
<b>KOKKUVÕTE</b> .....		39
<b>SUMMARY</b> .....		40
<b>TÄNUAVALDUSED</b> .....		41
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....		42
<b>LISAD</b> .....		48

## LÜHENDID JA MÕISTED

AFC	Antraalfolliikulite arv ( <i>antral follicle count</i> )
Ahr	Aromaatne süsivesinikretseptor ( <i>aromatic hydrocarbon receptor</i> )
AMH	Anti-Mülleri hormoon
BMP-15	Luu morfogeneesi valk 15 ( <i>bone morphogenetic protein 15</i> )
BPES	<i>Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus</i> sündroom
<i>BRCA1</i>	Rinnavähigeen 1 ( <i>breast cancer gene</i> )
CNV	Koopiaarvu variatsioon ( <i>copy number variation</i> )
<i>DACH2</i>	<i>Dachshund</i> homoloog 2
DGV	Genoomsete ümberkorralduste variantide andmebaas ( <i>Database of Genomic Variants</i> )
<i>FMR1</i>	Fragiilse X-i vaimse arengu mahajäävuse geen 1 ( <i>The Fragile X mental retardation 1 gene</i> )
FMRP	FMR valk ( <i>FMR protein</i> )
FSH	Folliikule stimuleeriv hormoon
FSHR	FSH-retseptor
FXPOI	Fragiilse X-seoseline primaarne munasarja puudulikkus ( <i>fragile X-related primary ovarian insufficiency</i> )
GALT	Galaktoos-1-fosfaaturidüültransferaas
GDF-9	Kasvu diferentseerumise faktor 9 ( <i>growth differentiation factor 9</i> )
HMM	Peidetud Markovi mudel ( <i>Hidden Markov model</i> )
<i>INHA</i>	Inhibiin- $\alpha$ subühiku geen
LH	Luteiniseeriv hormoon
LHR	LH-retseptor
LOH	Heterosügootsuse kaotanud ala ( <i>loss of heterozygosity</i> )
<i>MSH5</i>	MutS homoloog 5
OMIM	Inimese Pärilike Haiguste andmebaas ( <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> <sup>®</sup> )

POF	Enneaegne munasarjade võimetus ( <i>premature ovarian failure</i> )
POI	Primaarne munasarjade puudulikkus ( <i>primary ovarian insufficiency</i> )
RT-qPCR	Reaalaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> )
SCA-POI	Steroidrakkude autoimmuunsusest tulenev POI ( <i>steroid cell autoimmunity primary ovarian insufficiency</i> )
SNP	Ühenukleotiidne polümorfism ( <i>single-nucleotide polymorphism</i> )
<i>STS</i>	Steroid sulfataasi geen
TS	Turneri sündroom
VCD	4-vinüülsüklohekseen diepoksiid ( <i>4-vinylcyclohexene diepoxide</i> )
<i>ZFX</i>	<i>X-linked zinc finger</i> geen

# SISSEJUHATUS

Naiste viljatus on oluline sotsiaalprobleem ja tervisehäda. Naise viljatuse üks peamisi põhjusi on primaarne munasarjade puudulikkus (*primary ovarian insufficiency*; POI), mis on saamas üha enam huvipakkuvaks uurimisteenaks oma kõrge haigusjuhtumite arvu ja efektiivse ravi puudumise tõttu.

POI tekkepõhjused on väga heterogeensed, olles seotud nii geneetiliste põhjuste, vähiravi kui ka metaboolsete, viiruslike ja autoimmuunsete haigustega. Ligi veerand POI vormidest on iatrokeensed, seotud nii radio- ja kemoterapia aga ka vaagnaluu operatsioonidega, kuid pea pooltel haigusjuhtumitel on täpne etioloogia endiselt teadmata. On võimalik, et mitmel neist on geneetiline põhjus, mida toetab ka haiguse sage esinemine perekondades.

Traditsiooniline karütüpiseerimine on olnud peamine analüüsimeetod POI patsientidel genoomsete ümberkorralduste detekteerimiseks, kuid antud tehnoloogiaga pole võimalik tuvastada alla 10 Mb suurusi genoomseid aberratsioone. Viimastel aastatel on üha enam hakatud kasutama POI patsientidel submikroskoopiliste koopiaarvu muutuste tuvastamiseks kõrge resolutsiooniga DNA mikrokiibi tehnoloogiaid. Antud meetodite abil on leitud mitmeid POI seoselisi koopiaarvu variatsioone ning kandidaatgeene.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli anda kirjandusel põhinev ülevaade primaarse munasarjade puudulikkuse olemusest ja selle peamistest tekkepõhjustest. Töö praktilise osa eesmärgiks oli kromosomaalse mikrokiibianalüüsi abil tuvastada primaarse munasarjade puudulikkuse diagnoosiga patsientidel haigusseoselisi koopiaarvu variatsioone ning vastavates piirkondades esinevaid POI seoselisi kandidaatgeene.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Primaarne munasarjade puudulikkus

Loomulik menopaus algab naistel keskmiselt 50-aastaselt, kuid ligi 9,7%-l naistest algab menopaus enne 45. eluaastat (tegu varajase menopausiga), 1%-l enne 40. eluaastat ja 0,1%-l enne 30. eluaastat (tegu enneaegse menopausiga). POI-d defineeritakse klassikaliselt kui neli kuud või enam kestvat amenorröad (menstruatsiooni puudumine alaliselt või ajutiselt) alla 40-aastastel naistel koos seerumi folliikule stimuleeriva hormooni (FSH) tõusuga menopausi tasemele (tavaliselt üle 40 IU/L, saaduna vähemalt ühekuuliste vahedega) ning östradioli taseme langusega alla 50 pg/mL, mis viitab hüpööstrogenismile. Sõltuvalt POI kujunemise elueast naisel jagatakse haigusjuhtum primaarseks amenorröaks, kui naisel pole menstruatsioon alanud enne 16-18. eluaastat, ja sekundaarseks amenorröaks, kui menstruatsioon on naisel alanud õiges vanuses, kuid katkeb hiljem neljaks või enamaks kuuks (Persani et al., 2010).

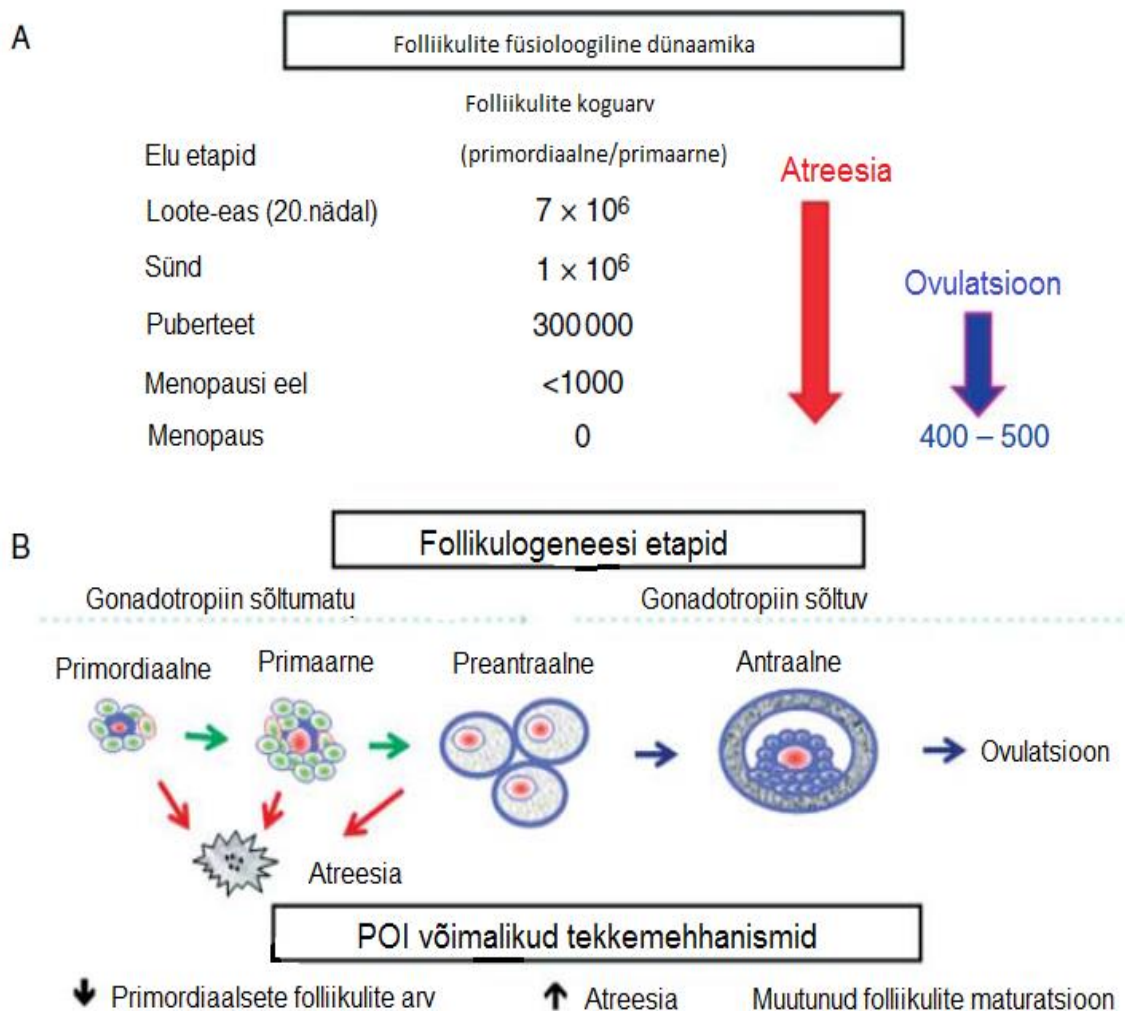
POI on varasemas teaduskirjanduses laialdaselt kasutusel olnud ka enneaegse munasarjade võimetuse (*premature ovarian failure*; POF) nimel all, kuid võttes arvesse tõendid POI pika ja varieeruva kliinilise pildi kohta, on pakutud välja primaarne munasarjade puudulikkuse termin, et teaduslikult täpsemalt kirjeldada kulgu munasarjade funktsiooni peatumiseni (Welt, 2008).

### 1.1.1 POI tagajärjed

POI tekitab kahte tüüpi tagajärgi. Üks neist on enneaegne hüpööstrogenism, mis omakorda põhjustab mitmete östrogeneeni sihtmärk-kudede enneaegset vananemist ning tuues seega kaasa osteoporoosi, kardiovaskulaarsete ja neurodegeneratiivsete haiguste riski tõusu. Teine tagajärg on viljatus. Hüpööstrogenismi saab praegusel ajal ravida hormoonasendusraviga kuni füsioloogilise menopausi kujunemiseani. Vastupidiselt, pole aga viljakust võimalik taastada peale POI diagnoosi ja sageli ei suudeta haigust diagnoosida varajases faasis, kui kliinilised tunnused puuduvad (Persani et al., 2010). Kuid pea 50%-l POI patsientidel, kel esinevad menopausile sarnased kliinilised näitajad, on täheldatud siiski muutuvat ja ettearvamatut munasarjade funktsiooni ning u 5-10% on suutnud rasestuda (Jin et al., 2012).

### 1.1.2 Mehhanismid, mis viivad munarakkude reservi enneaegse kahjustumiseni

Arenevas munasarjas on embrüogeneesi ajal olemas umbes 7 miljonit primordiaalseid folliikuleid. Suurem osa neist folliikulitest läheb kaotsi sünnieelses ja -järgses elus atreesia (folliikulite degenereerumine ja reabsorbeerumine) abil ning ainult 400-500 neist ovuleeruvad enne füsioloogilist menopausi. Võimalikud mehhanismid POI tekkeks võivad olla seega a) algsete primordiaalseid folliikulite hulga vähenemine, b) kiirenenud folliikulite atreesia või c) primordiaalseid folliikulite häiritud küpsemine ja munasarjast vabanemine (joonis 1) (Persani et al., 2010).



**Joonis 1 Folliikulite areng, küpsemine ja POI võimalikud tekkemehhanismid (A)** Folliikulite dünaamika ja füsioloogiline follikulogeneesi protsessi illustatsioon. (B) POI võimalikud tekkemehhanismid võivad mõjutada follikulogeneesi eri etappe (Persani et al., 2010).



### 1.1.3 POI diagnostika

POI tähtsus üha kasvab, kuna naised rasestuvad üha enam 30ndates ja 40ndates eluaastates. Seetõttu on sellealase teadustöö eesmärgiks kindlaks teha markerid, mis suudaks ette ennustada enneaegset menstruatsiooni peatumist ja seetõttu lubada POI riskiga naistel planeerida varajasemat rasestumist. Biokeemilised markerid, nagu FSH, östradiool, inhibiin B ja anti-Mülleri hormoon (AMH), on praegu peamiselt kasutusel kinnitamaks POI diagnoosi, millele viitab menstruatsiooni ebaregulaarsus. POI etteennustamine sõltub seetõttu suuresti haiguse patogeneesi paremast tundmisest ja uute kandidaatgeenide, antikehade ning usaldusväärsete biomarkerite avastamisest ja valideerimisest (Jin et al., 2012; Persani et al., 2010).

### 1.1.4 POI etioloogia

POI etioloogilised põhjused on väga heterogeensed ja võivad olla, kas a) geneetilised, sealhulgas aberratsioonid nii X-kromosoomil kui ka autosoomidel ja samuti mutatsioonid vastavates kromosoomides paiknevates geenides või nende regulatoorsetes alades, b) munasarjade autoimmuunsed kahjustused, c) metaboolsed haigused, d) viirusinfektsioonid, e) iatrokeensed faktorid, nagu radio- ja kemoteraapia ning ka vaagnaluu operatsioon või f) toksiinid ja muud elustiili ning keskkonna faktorid (Goswami and Conway, 2005; Jin et al., 2012). Umbes 25% kõigist POI vormidest võib klassifitseerida iatrokeenseteks ning on seotud vähiraviga, kuid rohkem kui 50% juhtumitest on idiopaatilised ja seega on POI tekkepõhjus endiselt suuresti teadmata (Persani et al., 2010). On võimalik, et suurel osal idiopaatilistel POI juhtudel on geneetiline põhjus, mida toetab ka haiguse sage esinemine perekondades (Cordts et al., 2011). Ligikaudu 10-15%-l POI juhtumitest on positiivne perekondlik seos. Samuti on mitmetel geenidel leitud seos perekondliku POI-ga (Jin et al., 2012). Davis jt uurisid 41 perekondlikku POI juhtumit ja leidsid selge geneetilise seose 11 juhtumi puhul. Ülejäänud 30 perekonna liikmetel ilmnes ülekaal uuritud naiste seas, mis võib viidata X-kromosoomi defektide olulisusele POI perekondlikes juhtudes (Davis et al., 2000).

## **1.2 POI geneetilised põhjused**

Geneetilisi põhjusi peetakse peamisteks menopausi iga määravateks faktoriteks ning samuti 7%-l POI tekkepõhjusteks. Kromosomaalsed aberratsioonid on peamiselt seotud X-kromosoomiga, kuid üha enam leitakse seoseid ka autosoomidega. Kuigi on leitud mitmeid POI-ga seotud geene, mille rolli patogeneesi tekkel mõistetakse, siis nende täpne geneetiline mehhanism jääb sageli siiski selgusetuks. Üldiselt võivad need aberratsioonid kahjustada meioosi väiksema geenidoosi ja mittespetsiifiliste kromosomaalsete defektide kaudu, vähendades niiviisi primordiaalsete folliikulite reservi ja kiirendades folliikulite atreesiat (Jin et al., 2012).

### **1.2.1 X-kromosoomi defektid**

POI üheks tekkepõhjuseks peetakse X-kromosoomil suuri aberratsioone tekitavaid defekte, nende hulgas ühe X-kromosoomi täielik deletsioon (Turneri sündroom), X-kromosoomi trisoomia, X-kromosoomi osalised deletsioonid või X:autosoomi translokatsioonid (Cordts et al., 2011).

#### **1.2.1.1 Turneri sündroom**

Turneri sündroom (TS) esineb 1:2500 vastsündinud tüdrukul ja seda kirjeldatakse tsütogeneetiliselt kui X-kromosoomi monosoomiat (45,X) (Cordts et al., 2011). Umbes 50%-l juhtudest esineb täielik ühe X-kromosoomi kaotus, samas ülejäänutel TS patsientidel võib olla tegu X-kromosoomi mosaiiksuse (u 25%) või struktuuriliste muutustega (u 25%), mis toob kaasa n-ö pehmema fenotüübi (Bharath et al., 2010). TS-iga naiste kliinilised tunnused on gonaadide degenereerumine koos primaarse amenorröaga, seksuaalne alaareng, nahavolt kaelal, küünarliigese hüperekstensioon ja lühike kasv (Cordts et al., 2011).

45,X karüotüübiga naistel esineb ootsüütide kaotus meioosi profaasi varajases staadiumis, tuues endaga kaasa juba lapseas gonaadide degenereerumise ja primaarse amenorröa koos kõrgendatud FSH tasemega. Siiski, spontaanset menstruatsiooni algust ja rasedust on esinenud mitte ainult mosaiikse karüotüübiga patsientidel, vaid ka mittemosaiikse 45,X

karüotüübiga naistel (Persani et al., 2010). TS-i fenotüüp võib olla tekkinud mitme mehhanismi poolt, nende seas X-kromosoomi defektne paardumine meioosi käigus, kuid kõige põhjendatum neist on X-seoseliste geenide haplopuudulikkus (geenid, mis ei osale X-kromosoomi inaktivatsioonis ja mida vajatakse munasarjade funktsiooni tagamiseks kahes koopias) (Zinn et al., 1998). Kahekordse doosi vajalikkust teatud X-liitelistel geenidel võib tõestada tähelepanek, et 30-40%-l mosaiikse karüotüübiga TS-iga patsientidel kujuneb välja täielik spontaanne puberteet ja samuti sageli on neil FSH-i tase palju madalam võrreldes 45,X karüotüübiga patsientidel (Persani et al., 2010).

### **1.2.1.2 X-kromosoomi trisoomia**

X-kromosoomi trisoomia (47,XXX) puhul on tegu sugukromosoomi aneuploidiaga, mis esineb 1:1000 vastsündinud tüdrukul, kuid arvatakse, et seda diagnoositakse vaid u 10%-l juhtudest (Tartaglia et al., 2010). Seda haigusjuhtumit kirjeldati esmalt 1959.aastal 35-aastasel naisel, kel olid normaalsed intellektuaalsed võimed, kuid esines sekundaarne ammenorröa 19.eluaastast (Jacobs et al., 1959). Peale algset avastust on kirjeldatud vaid paarsada juhtumit, kus fenotüübiline varieeruvus on olnud suur. Kuigi mittemosaiiksed 47,XXX karüotüübid on kõige sagedasemad, siis u 10%-l juhtudest on leitud mosaiiksust erinevates kombinatsioonides, nagu 46,XX/47,XXX ja 47,XXX/48,XXXX, või kombinatsioonis TS-i rakuliinidega, nagu 45,X/47,XXX ja 45,X/46,XX/47,XXX (Tartaglia et al., 2010). Kuigi enamikel juhtudel meditsiinilisi probleeme ei esine, siis X-kromosoomi trisoomia puhul on täheldatud urogenitaalsüsteemi häireid, seal hulgas munasarjade ja emaka väärarenguid (Lin et al., 1993). Mitmetel X-kromosoomi trisoomiaga naistel on kirjeldatud POI-d, kuid suuremat uuringut POI levimuse kohta 47,XXX noorukite ja täiskasvanute seas ei ole läbi viidud (Tartaglia et al., 2010). Goswami jt viisid läbi 52 POI patsiendi geneetilise skriiningu ja leidsid 2 patsienti X-kromosoomi trisoomiaga ning järeldasid, et 3,8%-l POI patsientidest esineb 47,XXX karüotüüp (Goswami et al., 2003).

### **1.2.1.3 X-kromosoomi ümberkorraldused ja POI**

Tasakaalustatud X:autosoom translokatsioonidega POI patsientide tsütogeneetilised ja molekulaarsed analüüsid viisid X-kromosoomi pikal õlal Xq13.3–q27 munasarjade arenguks,

funktsiooniks ja säilumiseks n-õ kriitilise regiooni avastamiseni (Rizzolio et al., 2006). Peaaegu kõiki selles regioonis asuvaid terminaalseid deletsioone on seostatud primaarse amenorröaga ja munasarjade häirega. See piirkond on jagatud kahte funktsionaalselt erinevasse osasse: Xq13.3-q21.1, mis kannab nime POF-2, ja Xq21.3-q27, mis kannab nime POF-1. Tasakaalustatud translokatsioonide korral asub enamik murdepunkte POF-2 regioonis, kuid samas POF-1 regioonis (täpsemalt Xq25-26) olevate murdepunktidega patsientidel kaasneb sageli sekundaarne amenorröa (Jin et al., 2012). Munasarjade defekti põhjustavad mehhanismid võivad sõltuda kriitilise regiooni Xq suurusest, millega piirnevates geenides toimunud ümberkorraldused võivad põhjustada positsiooni efekti või otsest lookuse katkestust. Positsiooni efekt on mehhanism, mille puhul deleteerub või translokeerub regulatoorne domään genoomi teise piirkonda, mis võib endaga kaasa tuua muutusi geenide transkriptsioonis (Persani et al., 2010).

On välja pakutud hüpotees, et aktiivse X-kromosoomi epigeneetilised ümberkorraldused võivad põhjustada positsiooni efekti autosomaalsete geenide promootoritele tasakaalustatud translokatsioonide kaudu (Persani et al., 2010). Rizzolio jt näitasid, et Xq13-q21 heterokromatiini ümberkorraldused surusid alla munasarjas ekspresseeritud geene folliikulite ja munaraku arengu ajal, viidates X-liitelise POI epigeneetiliste põhjuste võimalikkusele (Rizzolio et al., 2009). On välja pakutud idee, et mõned translokatsioonid rikuvad X-kromosoomi struktuuri, tuues kaasa defektse meiootilise paardumise ja idurakkude kiirendatud apoptoosi meioosi kontrollpunktides, mis võib viia POI tekkele (Persani et al., 2010).

## **1.2.2 POI-ga seotud geenid X-kromosoomil**

### **1.2.2.1 *FMR1* geen**

Fragiilse X-i vaimse arengu mahajäämuse geen 1 (*The Fragile X mental retardation 1 gene; FMR1*) asub Xq27.3 (Goswami and Conway, 2005). *FMR1* mutatsioon võib tekitada polümorfse CGG-korduste arvu suurenemise 5' mittetransleeritavas alas. See korduste ala võib muutuda ebastabiilseks pikkuse suurenemisel põlvkonnast põlvkonda. Vastavalt korduste arvule jagatakse alleelid 4 klassi: normaalne (26-34 kordust), keskmine (35-54 kordust), premutatsioon (55-199 kordust) ja täismutatsioon (üle 200 korduse) (Gleicher et al., 2012). Täismutatsiooni korral geen vaigistatakse metüleerides, mis toob kaasa FMR valguga (FMR

*protein*; FMRP) ekspressiooni puudumise ja intellektipuude kujunemise. *FMR1* geeni premutatsioon, eriti u 80-99 kordust, on kõige sagedasem spontaanse 46,XX POI geneetiline põhjus. Kujunevat POI-d nimetatakse fragiilse X-i seoseline primaarne munasarja puudulikkus (*fragile X-related primary ovarian insufficiency*; FXPOI). Premutatsiooniga alleele ei metüleerita ja neilt suureneb *FMR1* transkriptsioon, kuid väheneb FMRP tase. Premutatsioon esineb u 7%-l sporaadilise POI ja u 21%-l perekondliku POI-ga juhtumil, see on märgatavalt suurem arv, võrreldes üldpopulatsiooniga. Premutatsiooniga naistel täheldatakse sageli munasarjade funktsiooni vähenemist erinevas raskusastmes sõltuvalt CGG-korduste arvust ja keskkonnanafaktoritest. Täismutatsiooni ei seostata POI-ga. Suurenenud korduste arv võib mängida rolli POI patogeneesis mRNA transkripti taseme tõusu kaudu. Hetkel töötatakse välja *FMR1* premutatsiooni detekteerimisvõimaluse kasutamist rutiinse biomarkerina, mille abil tuvastada potentsiaalseid POI patsiente (Jin et al., 2012).

#### 1.2.2.2 *BMP-15*

Luu morfogeenesi valk 15 (*bone morphogenetic protein 15*; BMP-15) ja kasvu diferentseerumise faktor 9 (*growth differentiation factor 9*; GDF-9) on pea kõigi folliikulogeneesi etappide ajal folliikulites esinevad kasvufaktorid. Nad jagavad kattuvat primaarstruktuuri ja aegruumilist ekspressioonimustrit munasarjas. Nende kahe valgu rollid folliikulite kasvus ja arengus võivad olla koöperatiivsed, kuid nad omavad liigile omaseid granuloosaraku vastuseid. *GDF-9* asub autosoomil 5q31.1 alas, kuid *BMP-15* geen jääb X-kromosoomi väikse õla POI kriitilisse regiooni Xp11.2 (Jin et al., 2012).

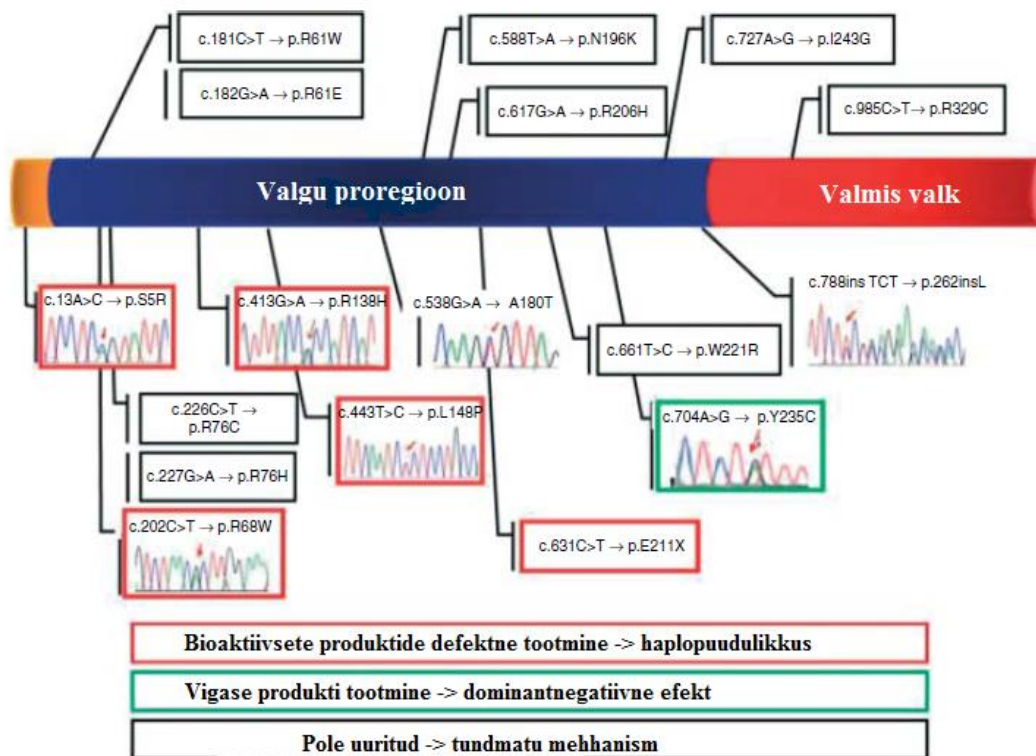
BMP-15 on ootsüüdispetsiifiline kasvu- ja diferentsioonifaktor, mis stimuleerib follikulogeneesi ja granuloosarakkude kasvu. On näidatud, et *BMP-15 knock-out* isastel hiirtel esineb normaalne viljakus, kuid emaste viljakus on langenud ning väiksem on ka pesakonna suurus (Jin et al., 2012; Yan et al., 2001).

Esimene POI-ga seotud *BMP-15* mutatsioon avastati kahel õel, kel oli normaalne karüotüüp, kuid esines hüpergonadotroopne munasarjade puudulikkus munasarjade düsgeneesi tõttu. See mutatsioon oli A-G transitsioon *BMP-15* geeni 704. aluspaaril, mis tekitas mittekonserveerunud asenduse p.Y235C (joonis 2). Tegu oli heterosügootse dominantnegatiivse mutatsiooniga, mille tütreid pärisid tervelt isalt. Antud mutatsioon põhjustas valgu valet protsessimist, mistõttu mutantne BMP-15 antagoniseeris metsiktüüpi

valgu stimulatorset aktiivsust ja selle kaudu vähendas granuloosarakkude proliferatsiooni (Di Pasquale et al., 2004).

Hiljem on leitud mitu uut mutatsiooni *BMP-15* geenis USA, Euroopa, Põhja-Aafrika, India, Hiina ja Aasia POI patsientide hulgas (joonis 2). Peaaegu kõigi puhul oli tegu heterosügootsete *missense* mutatsioonidega. Need asusid *BMP-15* valgu proregiooni kodeerivas geeni järjestuses, mis on oluline valgu protsessimises ja bioaktiivsete dimeeride sekretsioonis. Antud *missense* mutatsioonidega rekombinantseid produkte uuriti ja leiti, et mutatsioonidega vektorid tootsid muutunud hulgal *BMP-15* valmis valku võrreldes metsiktüübiga, viidates valgu kahjustunud protsessimisele. Kasutades *BMP* tundlikku lutsiferaasi reporteranalüüsi inimese granuloosarakkude liinil, näidati nende mutatsioonidega kaasnevat märkimisväärset bioloogilise efekti vähenemist. Defektsete mutantide ja võrdse hulgal metsiktüüpi *BMP-15* cDNA-ga läbi viidud kotransfektsiooni katsega ei suudetud täiesti taastada normaalset transkriptsioonilist aktiivsust. Kuna ka Western-blot analüüsil tuvastati, et bioaktiivse valgu tootmine on vähenenud, siis arvati, et antud heterosügootsed *missense* mutatsioonid võivad põhjustada *BMP-15* geeni haplopuudulikkust. Kõigi leitud mutatsioonide hulgas põhjustas üks (p.E211X) enneaegset stoppkoodonit proregioonis, mis tõi kaasa valmis *BMP-15* valgu täieliku puudumise (Persani et al., 2010; Rossetti et al., 2009). Esimene valmis valku kodeerivas *BMP-15* regioonis leitud *missense* asendus (p.R329C) võib kahjustada valgu õiget voltumist ja muuta seeläbi *BMP-15* valgu struktuuri, kuid selle tõestuseks on vaja teha lisakatseid (Wang et al., 2010).

Erinevate lambatõugude uurimisel on avastatud *BMP-15* geenis mitmeid punktmutatsioone, mis võivad mõjutada ovulatsiooni varieeruvust. *BMP-15* ja/või *GDF-9* eellasvalkude häiritud posttranslatsiooniline protsessimine vähendab valmis valkude hulka ja seda seostatakse suurenenud ovulatsiooni ning pesakonna hulgaga. Seetõttu, need mutatsioonid võivad naistel reproduktiivse teatud varajases faasis enne POI diagnoosi põhjustada kiirenenud ovulatsiooni ja viljakust, suurendades disügootsete kaksikute võimalikkust, kuid samas hilisemas eas põhjustada POI-d enneaegse munasarjade reservi vähenemise tõttu (Inagaki and Shimasaki, 2010; Jin et al., 2012)



**Joonis 2. POI patsientidel tuvastatud *BMP-15* geeni variandid (Persani et al., 2010).**

Eri värvi kastid näitavad võimalikke variantidega seotud bioloogilisi mehhanisme, mida Di Pasquale ja Rossetti töörühmad *in vitro* testisid (Di Pasquale et al., 2004; Rossetti et al., 2009). Kahel ilma ümbritseva kastita variandil ei tuvastatud funktsionaalset defekti ja neid peaks arvatavasti pidama *missense* mutatsioonideks puuduva või mõõduka bioloogilise efektiga. Esimese valmis valgus leitud mutatsiooni bioloogiline mõju on hetkel teadmata.

### 1.2.2.3 Teised potentsiaalsed POI tekkega seotud geenid X-kromosoomil

Potentsiaalsed POI tekkega seotud geenid X-kromosoomi pikal õlal on a) *Diaphanous* homoloog 2 (*DIAPH2*), mida on seostatud tsütoskeletiga ja osalusega oogeneesis; b) *Dachshund* homoloog 2 (*DACH2*); c) *POF1B*, mis asub POF-2 distaalses Xq21 ja mida seostatakse rakujagunemisel olulist rolli omava mittelihaselise müosiiniga; d) X-inaktiveeriv geen (*XIST*), mis asub Xq13 ja mida seostatakse munasarjade arenguks oluliste geenide haplopuudulikkusega; e) X-propüülaminopeptidaas 2 (*XPNPEP2*), mis asub kriitilises regioonil Xq25; f) FSH primaarse vastuse homoloog 1 (*FSHPRH1*), mis asub Xq22 ja mida ekspresseeritakse arnevas munasarjas (Jin et al., 2012).

### 1.2.3 POI-ga seotud geenid autosoomidel

#### 1.2.3.1 *GDF-9*

*GDF-9* on ootsüütide poolt sekreteeritav kasvufaktor, mis mõjutab ootsüütide, granuloosa- ja teekarakkude diferentseerumist. *GDF-9* geen asub 5.kromosoomil (5q31.1). On näidatud, et *GDF-9 knock-out* hiirtel isaste fertiilsus ei ole häiritud, samas emased on viljatud (Dong et al., 1996). Neil emastel hiirtel olid palju väiksemad munasarjad võrreldes metsiktüübiga, kuna arvatavasti olid neil granuloosarakud kaotanud oma mitootilise võime ja folliikulite kasv oli blokeeritud primaarses ühe kihi folliikuli staadiumis (Otsuka et al., 2011). *GDF-9* geeni kodeerivas regioonis on lammastel avastatud mitmeid ühenukleotiidseid polümorfisme (*single-nucleotide polymorphism*; SNP), millest p.S77F ja p.S109R homosügootseid variante seostatakse emaste lammaste steriilsusega (Hanrahan et al., 2004; Nicol et al., 2009). Palmer jt leidsid 6 uut *GDF-9* varianti disügootsete kaksikute emadel. *GDF-9* geeni variandid olid palju rohkem levinud disügootsete kaksikute emade kui kontrollrühma seas, viidates *GDF-9* variantide seosele polüovulatsiooniga. Samuti on leitud seost POI ja kaksikute saamise vahel. Nimelt, on leitud, et disügootsete kaksikute emadel saabub menopaus palju varem kui monosügootsete kaksikute emadel (Palmer et al., 2006).

#### 1.2.3.2 *FOXL2*

*Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus* sündroom (BPES) on autosomaaldominantne haigus, mida põhjustab *FOXL2* geeni mutatsioon. BPES-i iseloomustatakse silmalau kompleksse väärarenguga. Sõltuvalt POI esinemisest jagatakse BPES-i kaheks. Esimest tüüpi BPES-iga kaasneb POI. *FOXL2* geen paikneb 3q22-23 (Goswami and Conway, 2005). Pisarska jt näitasid, et *FOXL2* on koekspressseeritud *LATS1*-ga hiire munasarja väikeste ja keskmiste folliikulite granuloosarakkudes. *LATS1* fosforüleerib *FOXL2* seriinijääkidel ja toetab selle kaudu *FOXL2* represeerivat aktiivsust *StAR* promootorile, mis osaleb granuloosarakkude diferentseerumises. Mutantne *FOXL2* või tema ebaõige reguleerimine *LATS1* poolt võib kaasa tuua valel tasemel granuloosarakkude diferentseerumise ja folliikulite maturatsiooni, mis võib olla POI põhjuseks (Pisarska et al., 2010).



### 1.2.3.3 Folliikuleid stimuleeriv hormoon ja luteiniseeriv hormoon

FSH ja luteiniseeriva hormooni (LH) rada hüpotalamuse-hüpofüüsi-munasarja telje osana on kesksel kohal munasarjade normaalses funktsioonis. *FSH-β* asub 11p13 ja selle geeni mutatsiooni on täheldatud kahel primaarse amenorröaga naisel (Matthews et al., 1993). FSH-retseptor (FSHR) on ülioluline munasarja folliikulite värbamises ja nende küpsemises. *FSHR* geen asub 2p21-p16. C566T (p.Ala189Val) *missense* mutatsioon leiti mitme Soome pere primaarse või sekundaarse amenorröaga 46,XX naisel, kuid samas see mutatsioon näib olevat haruldane mujal (Aittomaki et al., 1995). Kuuel POI patsiendil on avastatud üheksa erinevat nn funktsiooni kaotavat mutatsiooni ja samuti on leitud *FSHR* mutatsioone, mida on seostatud resistantse munasarja sündroomiga (Bachelot et al., 2009; Goswami and Conway, 2005).

POI-ga naistel on leitud sagedamini LH-β subühiku variante kui kontrollrühmal ning LH-β homosügootne mutatsioon leiti sekundaarse amenorröaga naisel ja tema kahel hüpogonadismiga vennal (Lofrano-Porto et al., 2007). LH-retseptor (LHR) on oluline folliikulite ovulatsiooniks. *LHR* geen asub 2p21, mis on *FSHR* lookuse lähedal (Simpson, 2008). LHR mutatsioonid võivad põhjustada 46,XX naistel gonaadide degenerereerumist või POI-d. Latronico jt uurisid 46,XY väliste naissuguorganitega pseudohermafrodiidi ja tema viljatu ning ebraregulaarse menstruatsiooniga õe DNA-d. Neil esines gonaadide LH resistentsus, mille põhjuseks võis olla mõlemal *LHR* geenis leidunud deletsioon, mis viis Leu-608 ja Val-609 deleteerumiseni. Selle tulemusena oli suurem osa mutantsest retseptorist intratsellulaarselt säilinud. See väike osa mutantsest retseptorist, mida ekspresseeriti rakupinnale, sidus hormoone normaalselt, kuid oli võimetu aktiveerima endaga seotud G-alku (Latronico et al., 1998).

### 1.2.3.4 Inhibiin

Inhibiinil on kahekordne mõju FSH sekretsioonile hüpofüüsi ja gametogeneesi kaudu. On leitud tugev seos POI ja inhibiin-α subühiku geeni (*INHA*) variantide vahel, nagu näiteks G769A *missense* mutatsiooni esinemine India ja Uus-Meremaa naispopulatsioonis. *INHA* G769A mutatsiooni esinemissagedus on 0-11% erinevates populatsioonides. See mutatsioon toob kaasa normaalse dimeerse inhibiin A ja B tootmise, kuid põhjustab inhibiin B häiritud bioaktiivsust, mis võib olla seotud POI kujunemisega (Chand et al., 2010; Goswami and Conway, 2005). Madalat seerumi inhibiin B taset on seostatud reproduktiivse vananemise,

väheneva munarakkude reservi ja POI-ga. Arvatakse, et kui preantraalsete folliikulite arv väheneb teatud piirini, siis kaasneb sellega inhibiini B taseme langus, mis toob kaasa monotroopse FSH taseme tõusu, mis omakorda kiirendab folliikulite vähenemist ja menopausi saabumist (Petraglia et al., 1998; Soules et al., 1998).

### 1.2.3.5 Teised potentsiaalsed POI tekkega seotud geenid autosoomidel

Tabel 1 võtab kokku teised võimalikud POI tekkega seotud geenid naistel. Nende geenide kasutamiseks POI geneetilises diagnostikas on vaja läbi viia aga lisauuringud.

**Tabel 1 Potentsiaalsed POI tekkega seotud geenid ja nende kromosomaalsed asukohad (Jin et al., 2012 järgi, <http://www.omim.org><sup>1</sup>).**

Geeni nimi	Asukoht kromosoomil
Fragiilse X-i vaimse arengu mahajäämuse geen 2 ( <i>FMR2</i> )	Xq28
Vastsündinu munasarja <i>homeobox</i> geen ( <i>NOBOX</i> )	7q35
Faktor iduliinis- $\alpha$ ( <i>FIGL<math>\alpha</math></i> )	2p13.3
<i>Forkhead box O3</i> ( <i>FOXO3</i> )	6q21
Östrogeeni retseptor 1 geen ( <i>ESR1</i> )	6q25.1
Östrogeeni retseptor 2 geen ( <i>ESR2</i> )	14q23.2-q23.3
Tuuma retseptori alaperikond 5 ( <i>NR5A1/SF1</i> )	9q33.3
Eukariootne initsiatsiooni faktor 2B2, 4 ja 5 ( <i>EIF2B2</i> , <i>EIF4</i> ja <i>EIF5</i> )	14q24.3, 2p23.3, 3q27
<i>NOG</i> geen	17q22
17-hüdroksülaas ( <i>CYP-17</i> )	10q24.32
Wilmsi kasvaja supressorgeen-1 ( <i>WT1</i> )	11p13
<i>Ataxia telangiectasia</i> mutated ( <i>ATM</i> )	11q22.3
Mitokondriaalse DNA polümeraas- $\gamma$ geen ( <i>POLG</i> )	15q25
Konneksiin 37 ( <i>CX37</i> )	1p34.3
<i>CYP-19</i>	15q21.2
G-valk seoseline retseptor 3 ( <i>GPR3</i> )	1p36.11
LIM homeobox geen 8 ( <i>LHX8</i> )	1p31.1
<i>NANOS3</i>	19p13.13

### 1.2.3.6 Ülegenoomsed uuringud

Schuh-Huerta jt viisid läbi ülegenoomse uuringu munasarjade reservi kohta 25-45.aastaste regulaarse menstruatsiooniga ja reproduktiivselt normaalsete naiste seas. Uuringus osales 232 Euroopa päritolu ja 200 Afro-Ameerika naist, olles seega suurim teadustöö selles vallas. Teadlased analüüsisid üle genoomi FSH ja AMH-ga seotud geneetilisi variante ja avastasid mitu olulist SNP-d müeloid seotud diferentseerumismarkerilaadse (*myeloid-associated differentiation marker-like*; *MYADML*) geeni seest ja lähedalt. Neid variante seostati FSH tasemetega. Samuti leidsid nad mitu AMH ja FSH-ga seotud varianti samas genoomses regioonis 12p13.1-p13.2 ja 13q12.13, mis võib olla oluline piirkond munasarjade reservi mõjutavate alleelide jaoks. Ükski variant ei olnud ühegi teadaoleva munasarjadega seotud geeni sees või läheduses, seega uurimus pakkus välja häid kandidaatgeene POI geneetiliste põhjuste väljaselgitamiseks (Schuh-Huerta et al., 2012).

## 1.3 Metaboolsed haigused POI tekkepõhjusena – galaktoseemia

Klassikaline galaktoseemia on kaasasündinud autosoomretsessiivselt päranduv ainevahetushaigus, mis on põhjustatud 9. kromosoomis (9p13.3) paikneva galaktoos-1-fosfaaturidüültransferaasi (*GALT*) geeni defektist ja sellest tuleneva *GALT*-valgu puudulikkusest. Tõsisemad fenotüübid võivad põhjustada surmavat toksilist sündroomi ning kognitiivseid ja motoorseid häireid. 17-67% galaktoseemiat põdevatest naistest esineb POI ja uuringud näitavad, et klassikaline galaktoseemia põhjustab eri inimestel eri tasemel munasarjade häireid, kuid pea kõigil *GALT* geeni homosügootse mutatsiooniga naistel kujuneb POI varem või hiljem nende elus. FSH tase hakkab klassikalist galaktoseemiat põdevatel tüdrukutel sageli tõusma väga noores eas 4-kuuselt kuni 4-aastaselt. On näidatud, et vastsündinu munasarjad on normaalse morfoloogia ja follikulogeneesiga, kuid noortel naistel on primordiaalseste folliikulite arv suuresti vähenenud ja neil puuduvad küpsed folliikulid (Jin et al., 2012; Rubio-Gozalbo et al., 2010).

Folliikulite arenguhäire mehhanismid ja ajastus on endiselt ebaselge. On välja pakutud, et galaktoosi ja tema toksiliste metaboliitide kuhjumine peale sündi (kuna loote toksilised metaboliidid peaksid olema kiiresti eemaldatud ema ensüümide poolt) tekitab munasarjadele otsesi kahjustusi. Samuti kaasneb sellega glükoproteiinide ja –lipiidide hüpopglükosüleerimine,

oksüdatiivne stress ja apoptoosi aktiveerumine, mis omakorda võivad põhjustada FSH valetalitlust. Valet FSH glükosüleerimist on peetud põhiliseks POI tekkepõhjuseks galaktoseemiaga naistel. Gubbels jt võrdlesid FSH isovormide mustreid viie loomuliku menopausijärgse naise, viie galaktoseemiat põdeva ja ühe primaarse glükosüleerimisshäirega patsiendi vahel ning leidsid, et hüpoglükosülatsioonist tingitud vähemhappelised seerumi FSH isovormid ei ole märkimisväärselt seotud POI kujunemisega. Samuti võivad põhjuseks olla autoimmuunsusmehhanismid, kuid ühtegi antikeha ei ole siiani leitud (Forges et al., 2006; Goswami and Conway, 2005; Gubbels et al., 2011).

## 1.4 Autoimmuunhaigused POI tekkepõhjuseks

Uuring 357 POI patsiendiga näitas, et 14,3% haigusjuhtumitest on kliiniliselt või bioloogiliselt seotud autoimmuunsusega (Bachelot et al., 2009). Autoimmuunhaiguste esinemine POI põhjusena on teistes uuringutes hinnatud 10 kuni 55%-ni (Goswami and Conway, 2005).

POI-d seostatakse mitmete autoimmuunhaiguste ja –sündroomidega, nagu Addisoni tõbi, polüglandulaarne autoimmuunsündroom, kuiva silma sündroom, *myasthenia gravis*, reumatoidartriit ja süsteemne erütematoosne luupus (Jin et al., 2012). Bakalov jt viisid läbi uuringu 266 spontaanse POI-ga 46,XX naise seas ja leidsid seose histoloogiliselt kinnitatud autoimmuunse munasarjapõletiku ja neerupealiste koore antikehade vahel. Umbes 4%-l spontaanse POI-ga patsientidest esineb steroide tootvate rakkude antigeenide vastast autoimmuunsust (Bakalov et al., 2005). Autoimmuunset munasarjapõletikku kirjeldatakse kui ühetuumsete rakkude selektiivset infiltratsiooni antraalfolliikuli teekarakkude kihti. Steroidrakkude autoimmuunsusest tulenev primaarne munasarjade puudulikkus (*steroid cell autoimmunity primary ovarian insufficiency*; SCA-POI) on põhjustatud teekarakkude hävimisest autoimmuunsüsteemi poolt, mis toob kaasa inhibiini kontsentratsiooni tõusu. Samas on täheldatud 2/3-l SCA-POI-ga naistest normaalset seerumi AMH taset, mis tähendab, et neil patsientidel säilib ka teatud hulga funktsioneerivaid folliikuleid (La Marca et al., 2010).

Mitmed munasarja autoimmuunsusmehhanismid võivad põhjustada POI-d ja immunoloogilise tolerantsi häirimise võivad esile kutsuda nii geneetilised kui ka keskkonnafaktorid. Samas, munasarja antikehade patogeensuse tähtsus ja spetsiifilisus on siiski küsitav, seetõttu

autoimmuunsusest tingitud POI diagnoosimine on endiselt raske ülesanne. Võimalikud autoimmuunkahjustusi põhjustavad munasarjadega mitteseotud antikehad POI kujunemises on steroide tootvate rakkude, *zona pellucida* 3. epitoobi ja 3 $\beta$ -hüdroksüsteroiddehüdrogenaasi (3 $\beta$ -HSD) autoantikehad ning antitüroid-, antiparatüroid-, FSHR ja LHR vastased antikehad (Bakalov et al., 2005; Goswami and Conway, 2005).

## 1.5 Iatogeensed POI tekkepõhjused

Potentsiaalsed elupäästvad ravimeetodid, nagu kemo- ja radioteraapia, on väga mitmete POI juhtumite põhjuseks. Kemo- ja radioteraapia efekt sõltub ravimitüübist, radiatsioonivälja asukohast, doosist ja patsiendi vanusest (Goswami and Conway, 2005). Alkүүлiv ühend tsüklofosfamiid (*cyclophosphamide*; CYC) on rakutsükli mittespetsiifiline ravim, mis on tsütotoksiline isegi mitteaktiivsetele rakkudele ja seega ka gonadotoksiline, tuues kaasa kuni 40%-lise POI riski reproduktiivses eas naiste seas (Clowse et al., 2009). Alküleerivate ühendite, antimetaboliitide, antratsükliiliste antibiootikumide, vinka-alkaloidide või prednisolooni ravi läbinud patsientide munasarjade histoloogilised uuringud näitasid kortikaalset fibroosi, veresoonte kahjustusi ja vähenenud folliikulite arvu. Vähivastased ravimid peatavad sageli olulisi rakuprotsesse, peatavad rakkude proliferatsiooni ja seetõttu kahjustavad munasarjade stroomat ja folliikuleid. Kemoteraapia kahjustab kõige rohkem küpseid munasarja folliikuleid ravi ajal, indutseerides apoptoosi granuloosarakkudes. Kuid kahju suuruse väljaselgitamiseks primordiaalsele ja n-ö puhkavatele folliikulitele on vaja teha veel lisauuringuid (Jin et al., 2012).

Kuigi mõnede teadlaste arvates 65-70% POI juhtumitest on ümberpöörduvad pärast ravimite võtmise lõpetamist, siis pikaajalised viljakuse kahjustused on endiselt probleemiks. 26%-l keskmiselt 3,45-aastaselt kogu kõhule kiiritust saanud patsientidest kujunes ca 23,5-aastaselt välja POI. Olgugi, et nähakse palju vaeva kaitsmaks gonaade kiirituse eest vähiravi ajal, siis on ikkagi keeruline säilitada munasarjade funktsiooni puutumatuna. Isegi kraniaalne kiiritus võib mõjutada ovulatsiooni ja viljakust, häirides hüpotalamuse-hüpofüüsi-munasarja telge. Otsene kiiritus kahjustab munasarju sarnaselt kermoteraapiale, tuues kaasa folliikulite suurenenud aktivatsiooni ja põhjustades kiirendatud atreesiat (Jin et al., 2012).

Operatsioonid, eriti vaagnapiirkonnas, nagu hüsterektoomia, võivad samuti põhjustada POI-d, mõjutades munasarjade verevarustust või põhjustades lokaalseid põletikke (Amato and Roberts, 2001).

## **1.6 Viirushaigused POI tekkepõhjusena**

Mitmeid mumps ja munasarjade põletiku juhtumeid on peetud võimalikeks POI põhjusteks (Morrison et al., 1975). Ühendriikide multikeskuse uuring 1139 HIV seroposiitivse ja 292 seronegatiivse naise kohta näitas, et HIV seroposiitivsetel naistel oli kolm korda suurem tõenäosus läbi elada pikenenud amenorröad (vähemalt 1 aasta) kui HIV seronegatiivsetel (Cejtin et al., 2006). Pilootuuring Prantsusmaal mõõtis 78 HIV seroposiitivse naise munasarjade funktsiooni, kasutades markereid, nagu antraalfolliikulite arv (*antral follicle count*; AFC), FSH, inhibiin B ja AMH. Kõik need neli markerit olid ebanormaalselt kõrgete väärtustega. Need tulemused näitasid, et HIV infektsioon või kaasnev antiretroviirusteraapia võivad kahjustada munasarjade funktsiooni ja viljakust ning tuua kaasa POI väljakujunemise (Ohl et al., 2010).

## **1.7 Toksiinid ja muud keskkonna ning elustiili faktorid POI tekkepõhjusena**

4-vinüülsüklohekseen diepoksiid (*4-vinylcyclohexene diepoxide*; VCD) on munasarjadele toksiline kemikaal, mida tekib näiteks autorehvide tootmisel. VCD korduvad doosid võivad kiirendada atreesia apoptootilisi protsesse ja selektiivselt hävitada rottide ja hiirte primordiaalseid ja primaarseid folliikuleid. Molekulaarsed uuringud, kus kasutati vastsündinud roti terveid munasarju, näitasid, et VCD interakteerub spetsiifiliselt ja inhibeerib raku kasvuga seotud kriitilise signalisatsiooniraja võtmemolekulide c-kit retseptorite autofosforülatiooni ja seega häirib normaalset ootsüüdi kasvu. Seega, VCD-ga kokkupuutuvaid naisi peetakse POI tekke riskigruppi (Kappeler and Hoyer, 2012).

Suitsetamine võib kahjustada naise viljakust ja loodet raseduse ajal ning põhjustada enneaegset menopausi ja tõsta idiopaatilise POI tekkimise riski. Mõned uuringud väidavad, et

suitsetamine on seotud kõrgeenenud FSH tasemega ja teatud muudatustega AFC või AMH tasemetes, aga uuringud ja valideerimised suurema uurimisrühma peal on vajalikud (Jin et al., 2012). Tubaka toksiinid võivad mõjutada munasarjade reservi, kiirendades follikulaarset atroofiat ehk mahu vähenemist ja atreesiat läbi suurenenud apoptoosi primordiaalses idurakkudes (Schuh-Huerta et al., 2012). Näiteks polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud, mis on tubaka toksilised kemikaalid, mõjutavad aromaatses süsivesinikretseptori (*aromatic hydrocarbon receptor*; Ahr) kaudu *Bax* geeni ekspressiooni ootsüütides, millele järgneb apoptoos. Ahr-st sõltuv *Bax* geeni transkriptsioon on evolutsiooniliselt konserveerunud rakusurma signalisatsioonirada, mis põhjustab keskkonna mürkidest tulenevat munasarjade võimetust (Matikainen et al., 2001).

Sharara jt tõdesid kokkuvõtvalt oma artiklis, et keskkonna mürgid, nende seas endokriinsüsteemi kahjustajad, raskemetallid, lahustid, pestitsiidid, plastikud, tööstuskemikaalid ja tubakasuits, on seotud munasarjade võimetuse, reproduktiivsushäirete ja järglaste sünnidefektidega loomade seas, ent nende mürkide toimemehhanisme pole piisavalt kirjeldatud. Samuti leidsid nad vastuolulisi tulemusi inimeste seas nende mürkide kohta (Sharara et al., 1998).

Klein jt kirjutasid, et epilepsiat põdevad naised omavad suuremat riski POI kujunemises kui üldpopulatsioon (Klein et al., 2001). Samuti on eluaegset ebaregulaarset menstruaalmuutrit ja lastetust peetud POI riskifaktoriks (Testa et al., 2001).

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### Töö eesmärk

Minu magistritöö eesmärk oli kromosomaalse mikrokiibianalüüsi abil tuvastada primaarse munasarjade puudulikkuse diagnoosiga patsientidel haigusseoselisi koopiarvu variatsioone (*copy number variations*; CNVs) ning vastavates piirkondades esinevaid POI seoselisi kandidaatgeene.



## 2.1 Materjal ja metoodika

### 2.1.1 Uuritud patsientide fenotüübid

Käesolevas uuringus osales 21 primaarse munasarjade puudulikkuse diagnoosiga patsienti, kellel täpne haiguspõhjus on teadmata. Patsiendid pärinesid SA Tartu Ülikooli Kliinikumi naistekliiniku ja Reproduktiivmeditsiini TAK AS poolt koostöös kogutud primaarse munasarjade puudulikkusega patsientide hulgast. Uuritud patsientide fenotüübid on kokkuvõtlikult toodud tabelis 2.

**Tabel 2. Uuritud patsientide fenotüübid.**

Patsiendi kood	Vanus	BMI	Amenorröa	FSH (IU/L)
B1204	31	19.3	sec	31.1
B1209	19	22.6	sec	N/A
B1221	34	22	sec	88.6
B1228	41	21.1	sec	125
B1229	37	32.8	sec	57.8
B1230	39	26.2	sec	52
B1231	36	22.9	sec	98
B1232	33	19.3	sec	7.47
B1233	32	19.8	sec	80.4
B1234	34	20	sec	55.7
B1235	33	20.6	sec	33.7
B1236	35	25.2	sec	55.7
B1237	42	22.7	sec	42.7
B1238	30	N/A	N/A	N/A
B1239	31	29.1	sec	29.4
B1240	36	20.9	sec	60.4
B1241	29	22.9	sec	75.4
POF2	41	24.7	sec	89.6
POF20	N/A	N/A	N/A	N/A
POF21	N/A	N/A	N/A	N/A
POF22	N/A	N/A	N/A	N/A

BMI – kehamassiindeks (*body mass index*); sec – sekundaarne amenorröa

## 2.1.2 Mikrokiibianalüüs

CNV-de detekteerimiseks POI patsientidel teostati ülegenoomne SNP genotüpiseerimine Illumina HumanCytoSNP-12 mikrokiibi (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) tehnoloogiat kasutades. Genotüpiseerimise protseduur toimus, järgides tootjafirma poolt välja töötatud standardprotokolle ja kasutades tootja poolt valmistatud reaktiivide komplekte. Antud analüüside eksperimentaalne osa viidi läbi Eesti Biokeskuse Genotüpiseerimise Tuumiklaboris töötavate spetsialistide poolt. HumanCytoSNP-12 BeadChip-il paiknevad SNP proovid katavad kogu inimese genoomi keskmiselt 10 kb suuruste vahedega, võimaldades seeläbi ca 100 kb-st efektiivset lahutusvõimet (see on 10 järjestikust markerit). Antud mikrokiibil on ca 220.000 tsütogeneetiliseks analüüsiks vajalikku ülegenoomset SNP markerit ning lisaks sellele pea 250-le igapäevaselt tsütogeneetikalaboris kontrollitavale genoomsele regioonile spetsiifilised proovid, mille hulgas on subtelomeersed ja peritsentromeersed regioonid, sugukromosoomid ja lisaks ligi 400 haigusseoselist geeni ([http://www.illumina.com/products/humancytosnp\\_12\\_dna\\_analysis\\_beadchip\\_kits.ilmn](http://www.illumina.com/products/humancytosnp_12_dna_analysis_beadchip_kits.ilmn))<sup>2</sup>.

### 2.1.2.1 Genotüpiseerimistulemuste analüüs

Genotüpiseerimistulemusi analüüsiti programmidega GenomeStudio versioon 2011.1 (Illumina Inc.) ja QuantiSNP versioon 2.3 Beta (Colella et al., 2007). GenomeStudio programm kasutab saadud tulemuste analüüsimiseks kahte parameetrit: signaalide intensiivsuste logaritmiline suhe (*log R ratio*; LRR) ja alleelide intensiivsuste suhe (*B allele frequency*; BAF).

QuantiSNP genotüpiseerimisandmete analüüsiprogramm põhineb peidetud Markovi mudelil (*Hidden Markov model*; HMM). HMM on statistiline meetod, mis modelleerib andmeid lähtuvalt Markovi protsessist, kus iga kindla väärtuse esinemise tõenäosus teatud ajahetkel sõltub ainult eelmistel ajahetkedel esinenud väärtustest (Wang et al., 2008). QuantiSNP algoritmi puhul loetakse HMM-i protsessis koopiarv igas uuritud SNP-s peidetud väärtuseks, mida avaldakse genotüpiseerimiskiipide andmete põhjal, mis koosnevad iga SNP puhul kahest komponendist: LogR väärtusest, mis näitab SNP proovi summaarset fluoressentssignaali intensiivsust, ja B-alleeli sagedusest, mis näitab ühe SNP alleeli signaaliintensiivsuse osakaalu teise alleeli suhtes (Colella et al., 2007).

QuantiSNP kasutab SNP markerite summaarseid signaali intensiivsusi koos SNP alleelide osaintensiivsustega ja võimaldab statistilise võimsuse suurendamiseks korraga analüüsida mitme mikrokiibi andmeid. QuantiSNP kasutab Log Bayes faktorit usaldusväärsuse hindamiseks (*confidence score*) iga identifitseeritud regiooni jaoks. Mida suurem on Log Bayes faktori väärtus, seda tugevam on tõestus CNV olemasolu kohta antud regioonis (Colella et al., 2007). Selles töös kasutati Log Bayes faktori väärtust 10, mis tähendab, et 10% tuvastatud aberratsioonidest on valepositiivsed. Suuremate väärtuste kasutamine võib viia valenegatiivsete tulemuste arvu suurenemisele. Kõiki leitud CNV-sid võrreldi genoomsete ümberkorralduste variantide andmebaasis (*Database of Genomic Variants*; DGV) (<http://projects.tcag.ca/variation/>)<sup>3</sup> olevate CNV-dega sorteerimaks välja neutraalsed CNV-d ning samuti DECIPHER-i (*Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) andmebaasis (<http://decipher.sanger.ac.uk/>)<sup>4</sup> olevate CNV-dega leidmaks haigusseoselisi variante. Samuti, võrreldi olulisemaid tuvastatud CNV-sid Eesti Geenivaramu 1000 üldpopulatsiooni indiviidi CNV-de andmete ja sagedustega (Nelis et al., 2009).

### 2.1.3 Tulemuste kinnitamine reaallaja kvantitatiivsel PCR meetodil

Illumina kogu genoomi genotüpiseerimiskiiptide abil leitud olulisemad aberratsioonid kinnitati sõltumatul reaallaja kvantitatiivsel polümeraasi ahelreaktsiooni (*real-time quantitative polymerase chain reaction*; RT-qPCR) meetodil. CNV-de valideerimiseks disainiti praimerid vabavarana saadaval qRTDesigner versioon 1.2 programmi kasutades (<http://bioinfo.ut.ee/gwRTqPCR>)<sup>5</sup> ja telliti firmast metabion international AG (Martinsried, Saksamaa). Iga deletsiooni või duplikatsioon kinnitamiseks disainiti, kas 5 või 8 praimerpaari, vastavalt kaks või neli aberratsiooni sisse- ja kolm või neli väljapoole. Normaliseerimiseks kasutati kahte referentspraimerpaari. Praimerjärjestused on toodud lisas 1.

Praimerite efektiivsused määrati, rakendades standardkõvera meetodit. Standardkõvera loomiseks kasutati lahjenduste rida (32 ng/μl – 0,03125 ng/μl, kokku kuus erinevat lahjendust) viielt tsütogeneetilisel normaalse naise DNA segust. Andmed analüüsiti SDS 2.2.2. programmi abil (Applied Biosystems, Foster City, USA) ning efektiivsuse arvutamiseks kasutati järgmist valemit:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . Edasises töös kasutati ainult praimereid, mille efektiivsused jäid 1,8 – 2,2 piiridesse.

Edasine DNA koopiarvu hindamine toimus huvipakkuvates lookustes. Iga praimerpaariga teostati reaktsioonid, kasutades patsiendi DNA-d ning kontrollina viie tsütogeneetiliselt normaalse naise ja viie tsütogeneetiliselt normaalse mehe DNA segu. Normaalsete indiviidide DNA proove kasutati koopiarvu arvutamisel kalibreerimiseks.

10 µl reaktsioonisegu sisaldas 2 µl 5x HOT FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus'i (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Eesti); 1 µl *forward* + *reverse* praimereid kontsentratsiooniga 10 pmol/µl; 2,5 µl genoomse DNA lahust kontsentratsiooniga 1 ng/µl ning ddH<sub>2</sub>O lõppmahuni. Iga amplifitseerimisreaktsiooni teostati kolme kordusena.

Amplifikatsioon viidi läbi ABI 9700 Real Time system (Applied Biosystems) masinal, kasutades järgmist programmi: DNA polümeraasi aktiveerimine 95°C juures 15 min; 40 tsüklit: denaturatsioon 95°C juures 15 s, praimerite seondumine ja süntees 60°C juures 1 min. Esmase tulemuste analüüs toimus SDS 2.2.2. tarkvara abil, kus hinnati katse edukust ning spetsiifilisust. Järgnevalt analüüsiti andmeid qbase<sup>+</sup> arvutiprogrammiga (Biogazelle, Gent, Belgia), mis rakendab arvutamiseks delta-Ct meetodit (D'Haene et al., 2010).

## 2.1.4 LOH alades leitud POI-ga seotud geenide sekveneerimine

### 2.1.4.1 Polümeraasi ahelreaktsioon

Heterosügootsuse kaotanud (*loss of heterozygosity*; LOH) alades leitud POI-ga seotud geenide kodeerivate järjestuste amplifitseerimiseks teostati vastavate praimeritega polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*; PCR). Amplifitseeriti kolme geeni *BMP-15*, *DACH2* ja MutS homolog 5 (*MSH5*) eksonid. PCR reaktsiooni jaoks kasutati *BMP-15* geeni kahe eksoni, *DACH2* geeni kümne eksoni ja *MSH5* geeni teise eksoni spetsiifilisi praimereid. *MSH5* geenil amplifitseeriti vaid teine ekson, sest sealt on varasemalt leitud POI-ga seotud mutatsioone ning teist eksonit peetakse mutatsioonide *hotspotiks* (Mandon-Pepin et al., 2008). Antud praimerid disainiti vabavarana saadaval Primer3web programmi versioon 4.0.0 kasutades (<http://primer3.wi.mit.edu/>)<sup>6</sup> ja telliti firmast metabion international AG. Praimerite järjestused on toodud lisas 2.

PCR-i läbiviimiseks kasutati FIREPol<sup>®</sup> DNA Polymerase reagente FIREPol<sup>®</sup> DNA polümeraas 5 u/µl, (Solis BioDyne); 10x puhver; 25mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo-Fischer Fermentas, Vilnius, Leedu) ja nukleotiidide segu dNTP Mix, 2mM (Thermo-Fischer Fermentas). Amplifitseerimiseks kasutati 50 ng DNA-d, kogu reaktsiooni ruumala oli 20 µl.

Amplifitseerimisel kasutati masinat PTC-200 Thermo Cycler (GMI Inc., USA) ning järgmist programmi: DNA algdenaturatsioon 95°C juures 5 min; 35 tsüklit: denaturatsioon 95°C juures 30 sek, praimerite seondumine 59°C juures 1 min ja süntees 72°C juures 45sek; lõppsüntees 72°C juures 10 min.

PCR produktide kvaliteeti kontrolliti 1,5% agarosgeelil, kasutades markerit O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder (Thermo-Fischer Fermentas).

#### **2.1.4.2 Sekveneerimine**

Mutatsioonide detekteerimiseks sekveneeriti *BMP-15* geeni kõik kaks eksonit, *DACH2* geeni kümme eksonit ja *MSH5* geeni teine ekson ning nende lähedal asuvate intronite osad, kasutades samu primereid, millega amplifitseeriti DNA. Puhastatud PCR produktid sekveneeriti mõlemas suunas, et kinnitada esinevaid nukleotiidseid muudatusi. Sekveneerimisreaktsioonid teostati ja produktid analüüsiti Eesti Biokeskuse Sekveneerimise Tuumiklaboris masinal 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

#### **2.1.4.3 Andmete analüüs**

Järjestuste analüüsimiseks kasutati vabavarana saadaval Bioedit<sup>®</sup> programmi versioon 7.2.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)<sup>7</sup>. *BMP-15*, *DACH2* ja *MSH5* referentsjärjestusteks võeti vastava metsiktüüpi geeni eksonite DNA Ensembl Andmebaasist ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org))<sup>8</sup>. Lisaks võrreldi nii referentsgenoomi kui saadud järjestusi, kasutades ClustalW mitmekesist järjestuste joondamist, et vältida vigade esinemist (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)<sup>9</sup>.

## 2.2 Tulemused

### 2.2.1 Genotüpiseerimistulemused

#### 2.2.1.1 Koopiaarvu variatsioonid

Uuringus osales 21 patsienti, kellel oli diagnoositud primaarne munasarjade puudulikkus, kuid haiguse täpne põhjus oli teadmatata. Kõigi patsientide DNA-d analüüsiti HumanCytoSNP-12 BeadChip tehnoloogia abil. Kliiniliselt oluliste CNV-de tuvastamiseks jäeti kõrvale alla 10 Log Bayes faktori väärtusega olevad CNV-d ning neutraalseks peeti DGV andmebaasis<sup>3</sup> esinenud ja POI-ga seotud geenide alas mittepaiknenud CNV-d. Keskmiselt leiti iga uuritud genoomi kohta viis CNV-d, kusjuures enamik neist osutusid neutraalseteks. Kliiniliselt oluliseks peeti nelja CNV-d. Kiibianalüüside olulisemad tulemused on esitatud kokkuvõtlikult tabelis 3. Samuti, võrreldi olulisemaid CNV-sid Eesti Geenivaramu 1000 üldpopulatsiooni indiviidi CNV-de andmete ja sagedustega (Nelis et al., 2009). Antud CNV-de sageduste võrdlus on toodud välja tabelis 4.

Võimalikuks haigusseoseliseks CNV-ks peeti patsiendil POF2 esinenud 24,07 Mb suurust deletsiooni X-kromosoomil Xp22.33-p21.3 regioonis (lisa 3). Deleteerunud alas asub 89 Inimese Pärilike Haiguste (*Online Mendelian Inheritance in Man*<sup>®</sup>; OMIM) andmebaasis<sup>1</sup> refereeritud geeni, nende hulgas ka POI kandidaatgeen *ZFX* (*X-linked zinc finger gene* ; *ZFX*) ning potentsiaalne POI kujunemist mõjutav steroid sulfataasi geen (*STS*) (Goswami and Conway, 2005; Quilter et al., 2010).

Patsiendil POF20 leiti oluline CNV 1q21.1-q21.2 regioonis (lisa 4). Tegu oli 1,35 Mb suuruse deletsiooniga. Antud lookuses esinevat deletsiooni on seostatud närvisüsteemi arenguhäiretega (<https://decipher.sanger.ac.uk/syndrome/62>)<sup>10</sup>. Leitud deleteerunud alas asub üheksa OMIM andmebaasis refereeritud geeni.

Patsiendil B1237 avastati 78 kb suurune duplikatsioon 17q21.31 piirkonnas (lisa 5). Antud regioonis asub munasarja- ja rinnavähiga seotud rinnavähigeen 1 (*breast cancer gene*; *BRCA1*). *BRCA1* geenis asuvaid mutatsioone on seostatud ka naiste varasema menopausi ja varjatud POI kujunemisega (Lin et al., 2013; Oktay et al., 2010).

Patsiendil B1240 leiti võimalik POI seoseline CNV Xp22.31 regioonis (lisa 6). Tegu oli 1,2 Mb suuruse duplikatsiooniga. Antud alasse jääb neli OMIM andmebaasis refereeritud geeni, nende hulgas *STS* geen, mis võib mõjutada ootsüütide tootmist ja folliikulite küpsemist (Quilter et al., 2010).

Illumina kogu genoomi genotüpiseerimiskiipide abil leitud aberratsioonid on kinnitatud sõltumatul RT-qPCR meetodil, välja arvatud 24,07 Mb suurune deletsioon patsiendil POF2, mida on võimalik detekteerida karüotüübi analüüsil.

**Tabel 3. POI patsientidel mikrokiibi analüüsi käigus leitud olulisemad CNV-d.**

Patsient	POF2	POF20	B1237	B1240
<b>Kromosoom</b>	Xp22.33-p21.3	1q21.1-q21.2	17q21.31	Xp22.31
<b>Algusposits. (bp)</b>	2704609	146476526	41196363	6864358
<b>Lõpp-posits. (bp)</b>	26774900	147828939	41274789	8076813
<b>Alg-SNP ID</b>	rs5939323	rs6656361	rs8176320	rs5979096
<b>Lõpp-SNP ID</b>	rs5944594	rs3009465	rs8176085	rs5978816
<b>Pikkus (Mb)</b>	24,07	1,35	0,78	1,2
<b>Koopiaarv</b>	1	1	3	3
<b>Olulised geenid</b>	<i>ZFX ja STS</i>		<i>BRCA1</i>	<i>STS</i>
<b>OMIM<sup>1</sup>-is refereeritud geenide arv</b>	89	9	1	4

Koopiaarv 1 puhul on tegu deletsiooniga ja koopiaarv 3 puhul on tegu duplikatsiooniga.

**Tabel 4. POI patsientidel tuvastatud CNV-de võrdlus Eesti Geenivaramu 1000 üldpopulatsiooni indiviidi CNV-de sagedustega (Nelis et al., 2009).**

Patsient	Kromosoom	Algus (bp)	Lõpp (bp)	Pikkus (Mb)	Eesti 1000
<b>POF2</b>	Xp22.33-p21.3	2.704.609	26.774.900	24,07	
	X	6.468.166	8.095.053	1,6	0.008
	X	22.728.031	22.788.784	0,06	0.001
<b>POF20</b>	1q21.1-q21.2	146.476.526	147.828.939	1,35	
	1	147.414.362	147.849.072	0,4	0.015
<b>B1240</b>	Xp22.31	6.864.358	8.076.813	1,2	
	X	6.468.166	8.095.053	1,6	0.008
<b>B1237</b>	17q21.31	41.196.363	41.274.789	0,78	N/A

### 2.2.1.2 Heterosügootsuse kaotanud alad

Antud mikrokiibianalüüsi käigus tuvastati ka mitmeid heterosügootsuse kaotanud alasid. Oluliseks peeti LOH piirkondi, kus asus POI-seoselisi geene. Patsientidel leitud olulisemad LOH alad on esitatud kokkuvõtlikult tabelis 5.

Patsiendil POF20 leiti 13,24 Mb suurune LOH ala piirkonnas Xp11.23-p11.1, kus esineb *BMP-15* geen. Sama patsiendi X-kromosoomi pikas õlas tuvastati ka 29 Mb pikkune LOH ala Xq12-q21.31 piirkonnas, kus asub POI-seoseline *DACH2* geen (lisa 7).

Oluliseks leiuks peeti ka patsiendil B1235 esinenud 6,6 Mb suurust LOH ala 6p22.2-p22.32 piirkonnas, kus asub võimalik POI kujunemist mõjutav geen *MSH5* (lisa 8).

**Tabel 5. POI patsientidel mikrokiibi analüüsi käigus leitud LOH alad.**

Patsient	POF20	POF20	B1235
Kromosoom	Xp11.23-p11.1	Xq12-q21.31	6p22.2-p22.32
Alguspositsioon (bp)	45089619	62150601	26354572
Lõpp-positsioon (bp)	58339545	91158935	32943151
Alg-SNP ID	rs12012827	rs12690363	rs9461245
Lõpp-SNP ID	rs2942875	rs5942091	rs635688
Pikkus (Mb)	13,2	29	6,6
Koopiaarv	2	2	2
Olulised geenid	<i>BMP-15</i>	<i>DACH2</i>	<i>MSH5</i>
OMIM <sup>1</sup> -is refereeritud geenide arv	137	79	156

### 2.2.2 Sekveneerimistulemused

Mikrokiibi analüüsil tuvastatud LOH alades leidis kolm POI kujunemisega seotud geeni. Eelnevate uuringute käigus on näidatud, et LOH alades paiknevate geenide homosügootsed mutatsioonid võivad esile tuua retsessiivse fenotüübi ja olla geeneetiliselt heterogeensete haiguste põhjuseks (Alkuraya, 2010; Kearney et al., 2011). Et kontrollida, kas leitud LOH alades paiknenud POI tekkega seotud geenid asus mõni mutatsioon, sekveneeriti *BMP-15* geeni kõik kaks eksonit, *DACH2* geeni kümme eksonit ja *MSH5* geeni teine ekson. Sekveneerimistulemuste analüüsimisel ei tuvastatud ühtegi mutatsiooni *BMP-15*, *DACH2* ja *MSH5* geeni vastavates eksonites.



## ARUTELU

Primaarne munasarjade puudulikkus põhjustab naistel viljatust ja POI diagnoos on sageli ootamatu ning ebameeldiv uudis. Lisaks viljatusele kaasnevad POI-ga ka hormonaalsed muutused, mis võivad kaasa tuua osteoporoosi, kardiovaskulaarsete ja neurodegeneratiivsete haiguste riski tõusu. Pikaajaline hormoonasendusravi on vajalik, et leevendada menopausi sümptomeid ja ennetada östrogeeni puudujäägist tulenevaid pikaajaseid tagajärgi tervisele. Suur hulk hormoonasendusravi preparaate on olemas, kuid ükski uuring ei ole otseselt võrrelnud erinevaid hormoonravi võimalusi POI-ga naiste jaoks. Üldiselt on 100 µg-ne östradioli doos päevas transdermaalse plaastri kaudu soovituslik, et tagada tavapärane keskmine seerumi östradioli tase ja efektiivselt leevendada sümptomeid (Jin, Yu et al. 2012). On tõestatud, et mitmel spontaanse POI-ga naisel on alles munasarja folliikuleid, mis võivad teatud aja tagant funktsioneerida ja naised võivad rasestuda isegi mitmeid aastaid peale diagnoosi. Rasestumine on sageli toimunud tarbides östrogeeni ja progestiini, mis võib olla meetod viljakuse tõstmiseks neil naistel (Popat, Vanderhoof et al. 2008). Kunstlik viljastamine doonormunarakkudega on hetkel siiski ainuke viljatuse raviviis, millel on kõrge õnnestumistase POI-ga naiste seas. Samuti on POI patsientidel raseduse saavutamiseks kasutatud embrüote krüopreservatsiooni, millel on üpriski kõrge 30%-ne õnnestumistase (Goswami and Conway 2007).

Kuigi paljudel POI-ga naistel on võimalik erinevate viljatuse raviviiside abil rasestuda, siis peale POI diagnoosi pole normaalset viljakust võimalik enam taastada. Seetõttu on oluline välja töötada paremad POI diagnostikavõimalused, mis lubaks haiguse kujunemist ette ennustada. Kuid selle ülesande teevad keeruliseks POI väga heterogeensed etioloogilised põhjused ning samuti fakt, et pea pooltel POI juhtumitel on haiguse põhjus ja patogeneesi mehhanism teadmata. Samas, võivad POI-ga naisel leitud geneetilised aberratsioonid osutada kasulikuks perekondlikul nõustamisel, sest nende andmete abil oleks võimalik naissoost sugulastel ette ennustada POI kõrgeenenud riski ja viljakuse kaotust noores eas. Need naised saaksid seega planeerida lapse saamise varasemasse ikka enne POI kujunemist. See võimalus on muutumas üha olulisemaks tänapäeval, mil naised saavad lapsi üha enam 30ndates ja 40ndates eluaastates, mil POI kujunemise risk tõuseb (Persani et al., 2010).

Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida primaarse munasarjade puudulikkuse diagnoosiga patsiente, kellel oli haiguse täpne põhjus teadmata. POI-seoseliste koopiarvu variatsioonide

leidmine võib parandada teadmisi POI geneetiliste põhjuste ja selle heterogeense haiguse patogeneesi kohta ning võimaldaks arendada POI geneetilist testimist.

Antud töös leiti neli olulist CNV-d, millest kolmel võib olla seos POI kujunemisega (tabel 3). Võrreldes neid nelja CNV-d Eesti Geenivaramu 1000 üldpopulatsiooni indiviidi CNV sagedustega, tuvastati kolme CNV puhul madal esinemissagedus, kusjuures kahe CNV puhul oli tegu vaid osalise katvusega (tabel 4). Seega, niivõrd madala esinemissageduse juures ei saa need neli CNV-d olla neutraalsed, vaid tõenäoliselt on tegu haigusseoseliste CNV-dega.

Patsiendil POF2 leiti 24,07 Mb suurune deletsioon piirkonnas Xp22.33-p21.3. Antud deletsioon võib tõenäoliselt olla POI kujunemist mõjutav, sest X-kromosoomi väikse öla deletsioone regioonis X(pter-p21) on varasemalt seostatud POI kujunemisega ning antud regioonis asub POI kandidaatgeen *ZFX* ja potentsiaalne POI kujunemist mõjutav steroid sulfataasi geen (Quilter et al., 2010; Simpson and Rajkovic, 1999).

POI kandidaatgeeni *ZFX* ekspresseeritakse paljudes kudedes ja see asub Xp22.1-p21.3 piirkonnas. *ZFX* kodeerib ubikvitineeritult ekspresseeritud teadmata funktsiooniga tsink sõrme seoselist transkriptsioonifaktorit. *ZFX* klooniti algselt *ZFY* homoloogina, mis oli kunagine Y-kromosoomil testiseid määrava faktori kandidaatgeen. See geen pääseb X-kromosoomil inaktivatsioonist, nii et deletsioon või mutatsioon ühes koopias võib põhjustada haplopuudulikkust. *ZFX knock-out* hiired on väiksemad, vähem elujõulised ja viljakad ning neil on vähenenud idurakkude arv munasarjades ja munandites. *ZFX* geeni seostatakse ka naiste lühikese kasvuga (Goswami and Conway, 2005; Simpson and Rajkovic, 1999).

Teine POI-ga seotud geen antud deleteerunud alas oli steroid sulfataasi geen, mis ekspresseerib steroid sulfataasi ensüümi. STS katalüüsib sulfkeeritud steroidprekursorite muutmist östrogeeniks raseduse ajal. On teada, et *STS* ei osale X-kromosoomi inaktivatsioonis ning mutatsioonid *STS* geenis põhjustavad X-kromosoomiga seotud ihtüoosi meestel. *STS* ensüümi ületootmine võib põhjustada aga östrogeeni liiga suurt produktsiooni, mis võib omakorda alla suruda LH ja FSH tootmise ning selle kaudu mõjutada ootsüütide tootmist ja folliikulite küpsemist (Quilter et al., 2010).

Patsiendil B1240 leiti 1,2 Mb suurune duplikatsioon piirkonnas Xp22.31, kus samuti asub *STS* geen.

Patsiendil B1237 leiti 78 kb suurune duplikatsioon regioonis 17q21.31. Antud duplikatsioon jääb HumanCytoSNP-12 mikrokiibi efektiivse lahutusvõime piirimaile, ent kuna leitud

duplikatsioon on kinnitatud RT-qPCR meetodil, siis võib väita, et tegu on tõelise CNV-ga. Tuvastatud piirkonnas asub rinna- ja munasarjavähi tekkega seotud *BRCA1* geen. *BRCA* geenid on kasvaja supressorgeenid ja mängivad olulist rolli kaheahelaliste DNA katkete paranduses. Mitmed varasemad uuringud on näidanud, et *BRCA1* geeni haplopuudulikkus toob kaasa genoomse ebastabiilsuse ja võib põhjustada ning kiirendada kartsinogeneesi heterosügootsete *BRCA1* mutatsiooni kandjatel muutunud DNA paranduse ja DNA-d kahjustavate mõjude ülitundlikkuse kaudu (Konishi et al., 2011; Rennstam et al., 2010).

Varasemalt on näidatud olulist seost *BRCA1* geeni ja telomeeride pikkuse säilitamise vahel (McPherson et al., 2006). Telomeerid on nukleoproteiinsed kompleksid kromosoomide otstes, mis on vajalikud kromosoomide terviklikkuse säilitamiseks. Hanna jt näitasid, et enneaegse munasarjade vananemisega naistel on lühema pikkusega telomeerid kui normaalse munasarjade funktsiooniga viljakatel naistel. See uuringu tulemus toetab hüpoteesi *BRCA* mutatsioonide ja enneaegse munasarjade vananemise vahel (Hanna et al., 2009; Tea et al., 2013).

Oktay jt näitasid, et *BRCA1* mutatsiooniga patsientidel esines munasarjade stimulatsioonile nõrgem vastus *in vitro* viljastamisravi korral kui *BRCA1* mutatsioonita patsientidel ning *BRCA1* mutatsiooniga patsientidel oli väiksem arv munarakkse võrreldes kontrollrühmaga (Oktay et al., 2010). Munasarjade stimulatsiooni madalat vastust on varasemates uuringutes seostatud väheneva munasarjade reservi ja viljatusega. Seetõttu pakuti välja hüpotees, et kuna *BRCA* mutatsiooniga patsientidel on DNA katkete parandus puudulik, siis ootsüüdid võivad olla vastuvõtlikumad DNA kahjustustele. Folliikulid võivad munasarjades olla mitukümmend aastat ja nende ootsüütides võivad kuhjuda letaalsed DNA vead. On näidatud, et tõsiste ja parandamatute DNA kahjustuste korral aktiveeritakse somaatilistes rakkudes apoptoosirada. Seega on võimalik, et puuduliku *BRCA* funktsiooniga ootsüüdid kõrvaldatakse enneaegselt sarnase mehhanismi abil, tuues endaga kaasa varase munarakkude reservi ammendumise ja POI kujunemise (Oktay et al., 2010).

Tea jt võrdlesid *BRCA* geeni mutatsiooni kandjatel ja tervetel kontrollidel POI tekkega oluliselt seotud geeni *FMRI* genotüübi jaotuse mustrit. Uuringu tulemused näitasid *FMRI* genotüübi erinevat jaotust *BRCA1/2* mutatsiooni kandjatel võrrelduna kontrollrühmaga. Lisaks, *BRCA1/2* mutatsiooni kandjatel võib olla tendents lühemale reproduktiivaele, kuna sama töögrupi varasem uuring näitas, et *BRCA1/2* mutatsiooni kandjatel esinenud *FMRI* genotüüp esines ka viljastumisraskustega naistel. Seega, nende uuringute tulemused toetavad *BRCA* mutatsioonide seost naise reproduktioonis (Gleicher et al., 2011; Tea et al., 2013).

Lin jt näitasid oma uuringus, et *BRCA1/2* mutatsiooniga valgetel naistel kujuneb loomulik menopaus 3-4 aastat varem kui kontrollrühmal ning mutatsiooni kandvatel suitsetajatel veelgi varem (Lin et al., 2013). *BRCA1* geeni olulisust reproduktiivfunktsioonis toetavad ka uuringud loomadel. On näidatud, et vanemate emaste hiirte ootsüütides väheneb *BRCA1* ekspressioon ja *BRCA1* vaigistamine RNA interferentsi abil takistab noorte emaste hiirte ootsüütides kääviniitide moodustumist, mis viitab puutumata *BRCA1* funktsiooni olulisusele ootsüütide ellujäämisel (Pan et al., 2008).

Kuigi, antud artiklites kirjeldatud patsientidel esines *BRCA1* mutatsioonidena peamiselt deletsioonid ja insertioonid, on võimalik, et käesoleva uuringu käigus tuvastatud duplikatsioon võib patsiendil B1237 *BRCA1* geeni transkriptsiooni ja funktsiooni muuta ja seega olla seotud POI kujunemisega, kuid selle tõestuseks on vajalikud edasised uuringud antud mutatsiooni mõju kohta *BRCA1* geeni ekspressioonitasemele ja valgu funktsiooni osas.

Patsiendil POF20 leiti oluline CNV 1q21.1-q21.2 regioonis. Tegu oli 1,35 Mb suuruse deletsiooniga. Antud lookuses esinevaid deletsioone on varasemalt seostatud närvisüsteemi arenguhäiretega. Mefford jt avastasid 5218 patsiendi skriinimisel 1,35 Mb suuruse deletsiooni 1q21.1 regioonis 25 patsiendil. See mikroleletsioon oli kaheksal patsiendil tekkinud *de novo*, kolmel päritud haigestunud vanemalt, kuigi nende haigusfenotüüp ei olnud tõsine, ja kuuel patsiendil päritud näiliselt tervelt vanemalt ning kaheksal patsiendil ei olnud deletsiooni päritolu teada. See deletsioon puudus 4737 kontrollisikul. Antud deletsiooniga kaasnes märkimisväärne fenotüübiline varieeruvus: nõrk kuni keskmine vaimse arengu mahajäämus, mikrotsefaalia, südame väärarengud ja kae (Mefford et al., 2008).

Brunetti-Pierri jt kinnitasid 1q21.1 mikroleletsiooni seost pea kasvuga, deletsiooni puhul seost pea suuruse vähenemisega ja duplikatsiooni korral vastupidiselt pea suuruse suurenemisega. Nad avastasid antud deletsiooni 21 patsiendil, kel esines teiste fenotüübiliste iseärasuste seas ka südame väärarengud (6/21), liigete hüpermobiilsus või sidemete lõtvus (5/21), hüpotoonia (5/21), krambid (3/21) ja hall kae (3/21) (Brunetti-Pierri et al., 2008). Samuti on 1q21.1 deletsiooni leitud mittesündroomse skisofreeniaga patsientidel. 1q21.1 regiooni genoomsete aberratsioonidega seotud fenotüübiline mitmekesisus, mittetäielik penetrantsus ja kindlate sündroomsete tunnuste puudumine muudab selle regiooni kasutamise geneetilises nõustamises keeruliseks. Siiski, selle regiooniga seotud ümberkorralduste erinev esinemine patsientidel ja kontrollpopulatsioonis muudab selle kliiniliselt oluliseks leiuks, mis näib omavat eelsoodumust närvisüsteemi arenguhäireteks (<https://decipher.sanger.ac.uk/syndrome/62>)<sup>10</sup>.

Antud töös tuvastati mikroibiianalüüsil mitmeid heterosügootsuse kaotanud alasid. Oluliseks peeti kolme LOH piirkonda, kus asub varasemalt POI tekkega seostatud geene.

Patsiendil POF20 leiti 13,24 Mb suurune LOH ala piirkonnas Xp11.23-p11.1, kus esineb *BMP-15* geen. Sama patsiendi X-kromosoomi pikas õlas tuvastati ka 26,2 Mb pikkune LOH ala Xq12-q21.31 piirkonnas, kus asub POI-seoseline *DACH2* geen. Oluliseks leiuks peeti ka patsiendil B1235 esinenud LOH ala 6p22.2-p22.32 piirkonnas, kus asub võimalik POI kujunemist mõjutav geen *MSH5*.

*BMP-15* on ootsüüdispetsiifiline kasvu- ja diferentsioonifaktor, mis stimuleerib follikulogeneesi ja granuloosarakkude kasvu. Varasemalt on POI patsientidel leitud mitmeid mutatsioone *BMP-15* geenis. *BMP-15* geeni peetakse üheks olulisemaks POI tekkega seotud geeniks (vaata lehekülgi 12-14 ja joonis 2).

*DACH2* geeni seostati esmakordselt POI-ga selle avastamisel tasakaalustatud translokatsiooni murdepunktis X-kromosoomi kriitilises regioonis Xq13-q26 POI-ga patsiendil (Prueitt et al., 2002). *Dachshund* homoloogi geeni kirjeldati esimest korda aga *Drosophilal*, kus see kodeerib silmade, jäsemete ja genitaaldiski arenguga seotud tuumavalku. *Drosophilal* on üks *DACH* geen, kuid hiirel ja inimesel on avastatud kaks *DACH* geeni: *DACH1* ja *DACH2*. *DACH1* ja *DACH2* geenid on seotud emase hiire genitaaltrakti arenguga. Inimestel on *DACH2* geeni seostatud POI kujunemisega, kuna *DACH2* valgu muutused võivad häirida munasarja folliikulite diferentseerumist (Nodin et al., 2012). Bione jt teostasid mutatsiooni analüüsi *DACH2* geeni 13 eksonis 257-l itaalia POI patsiendil. Uuringu käigus tuvastati 15 SNP-i, millest viis olid geeni kodeerivas osas ja tõid kaasa aminohappe muutuse. Need kodeerivas regioonis olevad *missense* mutatsioonid olid sagedasemad POI patsientidel kui kontrollidel (Bione et al., 2004).

*MSH5* geen kuulub DNA *mismatch* parandusega seotud geeniperekonda. *MSH5 knock-out* hiired on elujõulised, kuid viljatud. Nendel hiirtel on meioos häiritud kromosoomide puuduliku paardumise tõttu profaasis I. Nende emaste hiirte munasarjad on sündides normaalse suurusega, ent degenerereeruvad järk-järgult väiksemaks ja vanusega väheneb neil ka ootsüütide arv. Mandon-Pépin jt sekveneerisid *MSH5* geeni 41 POI patsiendil ja 36 tervel naisel. Analüüsi tulemusel leiti *MSH5* geeni teises eksonis heterosügootne *missense* mutatsioon kahel patsiendil, ent mitte ühelgi kontrollil. See mutatsioon tõi kaasa mittepolaarse

aminohappe proliini asendumise polaarse aminohappe seriiniga positsioonil 29 (Mandon-Pepin et al., 2008).

Eelnevate uuringute käigus on näidatud, et heterosügootsuse kaotanud alades paiknevate geenide homosügootsed mutatsioonid võivad esile tuua retsessiivse fenotüübi ja olla geneetiliselt heterogeensete haiguste põhjuseks. Samuti võib homosügootsuse kaardistamine vähendada vajadust sekveneerida geneetiliselt heterogeense haiguse korral mitmeid haigusega seotud gene (Alkuraya, 2010; Kearney et al., 2011). Et kontrollida, kas leitud LOH alades paiknenud POI tekkega seotud geenides asus mõni mutatsioon, sekveneeriti *BMP-15* geeni kõik kaks eksonit, *DACH2* geeni kümme eksonit ja *MSH5* geeni teine ekson. Sekveneerimistulemuste analüüsimisel ei tuvastatud ühtegi mutatsiooni *BMP-15*, *DACH2* ja *MSH5* geeni vastavates eksonites.

## KOKKUVÕTE

Primaarse munasarjade puudulikkuse tekkepõhjusi on uuritud mitmeid aastaid, kuid endiselt pole haiguse täpne patogenees ning pea pooltel juhtumitel POI etioloogia teada. Viimastel aastal on üha rohkem uuritud haiguse geneetilisi põhjusi ja leitud mitmeid POI seoselisi kandidaatgeene ning koopiaarvu muutusi.

Käesoleva magistritöö raames uuriti 21 primaarse munasarjade puudulikkusega patsienti, et leida haigusseoselisi CNV-sid ja kandidaatgeene. CNV-de tuvastamiseks POI patsientidel teostati ülegenoomne kiibianalüüs, kasutades Illumina kogu genoomi SNP genotüpiseerimiskiipe. Lisaks, sekveneeriti kahel patsiendil kiibianalüüsil tuvastatud LOH alades leitud POI seoseliste geenide eksonid: *DACH2* kümme eksonit, *BMP-15* kaks eksonit ja *MSH5* teine ekson.

Antud töös tuvastati neli kliiniliselt olulist CNV-d, millest kolmel võib olla seos POI kujunemisega. Leitud CNV-d olid järgmised: 1) 24,07 Mb suurune deletsiooni Xp22.33-p21.3 regioon, kus asuvad POI kandidaatgeen *ZFX* ja potentsiaalne POI kujunemist mõjutav *STS* geen; 2) 1,2 Mb suurune duplikatsioon piirkonnas Xp22.31, kus asub samuti *STS* geen; 3) 78 kb suurune duplikatsioon 17q21.31 piirkonnas, kus asub munasarja- ja rinnavähigeen *BRCA1*, mida on samuti seostatud naiste varasema menopausi ja varjatud POI kujunemisega; 4) 1,35 Mb suurune deletsioon 1q21.1-q21.2 regioon. Antud lookuses esinevaid deletsioone on varasemalt seostatud närvisüsteemi arenguhäiretega. Leitud CNV-d on kinnitatud sõltumatul RT-qPCR meetodil, välja arvatud 24,07 Mb suurune deletsioon, mida on võimalik detekteerida karüotüübi analüüsil.

Samuti leiti kolm LOH ala, kus asus kolm POI seoselist geeni. Tuvastatud LOH alad olid järgmised: 1) Patsiendil POF20 13,24 Mb suurune LOH ala piirkonnas Xp11.23-p11.1, kus esineb *BMP-15* geen; ja 2) 29 Mb pikkune LOH ala Xq12-q21.31 piirkonnas, kus asub *DACH2* geen; 3) Patsiendil B1235 6,6 Mb suurune LOH ala 6p22.2-p22.32 piirkonnas, kus asub *MSH5* geen. Eelnevad uuringud on näidanud, et LOH alades paiknevate geenide homosügootsed mutatsioonid võivad esile tuua retsessiivse fenotüübi ja olla geneetiliselt heterogeensete haiguste põhjuseks. Et testida, kas antud geenides asub mõni POI seoseline mutatsioon, sekveneeriti *DACH2* kümme eksonit, *BMP-15* kaks eksonit ja *MSH5* teine ekson, kuid ühtegi mutatsiooni nende geenide eksonites ei leitud.

## **DNA copy number variations in women with primary ovarian insufficiency**

Kati Hiieleek

### **SUMMARY**

The causes of primary ovarian insufficiency (POI) have been studied for many years, but still the mechanism of the disorder and nearly half of the causing factors of POI remain unknown. In the recent years many studies have focused on the genetic factors of POI which has lead to finding new POI related candidate genes and copy number variations (CNVs).

During the current research project 21 patients with POI were screened to find CNVs and candidate genes connected to the disorder. Illumina's Whole-Genome SNP Genotyping analysis was performed using BeadArray chips to detect these CNVs. In addition, the exons of the POI related genes in the loss of heterozygosity (LOH) regions discovered by genotyping in two patients were sequenced to find mutations associated with POI.

We found four clinically relevant CNVs and three of them could be causing POI. The discovered CNVs were the following: 1) A deletion of 24.07 Mb in Xp22.33-p21.3 region where the POI related genes *ZFX* and *STS* are located in; 2) A duplication of 1.2 Mb in Xp22.31 region where also the *STS* gene is located in; 3) A duplication of 78 kb in 17q21.31 region where the ovarian and breast cancer *BRCA1* gene is situated. *BRCA1* mutations have also been associated with earlier age at natural menopause and POI; 4) A deletion of 1.35 Mb in 1q21.1-q21.2 region, which is a susceptibility locus for neurodevelopmental disorders. The CNVs have been confirmed by RT-qPCR method, except the 24.07 Mb deletion, which could be detected by karyotyping.

In addition, we detected three LOH regions by genotyping where three genes associated with POI are situated. The discovered LOH regions were the following: 1) A LOH region of 13.24 Mb in patient POF20 in Xp11.23-p11.1 region where the *BMP-15* gene is situated; 2) A LOH region of 29 Mb in patient POF20 in Xq12-q21.31 region where the *DACH2* gene is located in; 3) A LOH region of 6,6 Mb in patient B1235 in 6p22.2-p22.32 region where the *MSH5* gene is situated. Recent studies have shown that homozygous mutations in genes located in the LOH region increase the frequency of recessive phenotypes and therefore can be the cause of genetically heterogeneous conditions. We sequenced *DACH2* ten exons, *BMP-15* two exons and *MSH5* second exon to screen for mutations responsible for the development of POI, but we did not identify any mutations in these genes' exons.



## **TÄNUAVALDUSED**

Kõige enam soovin tänada oma juhendajat prof. Ants Kurge abistavate nõuannete ja toetuse eest magistritöö kirjutamisel. Samuti suured tänusõnad Olga Tšuiko, Olga Žilina, Margit Nõukas ja Merle Külaotsale väärtuslike õpetussõnade ja soovitude eest.

Täna ka koostööpartnereid prof. Andres Salumetsa ja SA Tartu Ülikooli Kliinikumi naistekliiniku ning Reproduktiivmeditsiini TAK AS töötajaid.

Lõpetuseks soovin tänada oma sõpru, perekonda ja kallist Indrekut, kelle toetusel nii kaugele olen jõudnud.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Aittomaki, K., Lucena, J. L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., Kaskikari, R., Sankila, E. M., Lehvaslaiho, H., Engel, A. R., Nieschlag, E., Huhtaniemi, I., and de la Chapelle, A. (1995). Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* **82**(6), 959-68.
- Alkuraya, F. S. (2010). Homozygosity mapping: one more tool in the clinical geneticist's toolbox. *Genet Med* **12**(4), 236-9.
- Amato, P., and Roberts, A. C. (2001). Transient ovarian failure: a complication of uterine artery embolization. *Fertil Steril* **75**(2), 438-9.
- Bachelot, A., Rouxel, A., Massin, N., Dulon, J., Courtillot, C., Matuchansky, C., Badachi, Y., Fortin, A., Paniel, B., Lecuru, F., Lefrere-Belda, M. A., Constancis, E., Thibault, E., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Misrahi, M., Kuttann, F., and Touraine, P. (2009). Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* **161**(1), 179-87.
- Bakalov, V. K., Anasti, J. N., Calis, K. A., Vanderhoof, V. H., Premkumar, A., Chen, S., Furmaniak, J., Smith, B. R., Merino, M. J., and Nelson, L. M. (2005). Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* **84**(4), 958-65.
- Bharath, R., Unnikrishnan, A. G., Thampy, M. V., Anilkumar, A., Nisha, B., Praveen, V. P., Nair, V., Jayakumar, R. V., and Kumar, H. (2010). Turner syndrome and its variants. *Indian J Pediatr* **77**(2), 193-5.
- Bione, S., Rizzolio, F., Sala, C., Ricotti, R., Goegan, M., Manzini, M. C., Battaglia, R., Marozzi, A., Vegetti, W., Dalpra, L., Crosignani, P. G., Ginelli, E., Nappi, R., Bernabini, S., Bruni, V., Torricelli, F., Zuffardi, O., and Toniolo, D. (2004). Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B. *Hum Reprod* **19**(12), 2759-66.
- Brunetti-Pierri, N., Berg, J. S., Scaglia, F., Belmont, J., Bacino, C. A., Sahoo, T., Lalani, S. R., Graham, B., Lee, B., Shinawi, M., Shen, J., Kang, S. H., Pursley, A., Lotze, T., Kennedy, G., Lansky-Shafer, S., Weaver, C., Roeder, E. R., Grebe, T. A., Arnold, G. L., Hutchison, T., Reimschisel, T., Amato, S., Geraghty, M. T., Innis, J. W., Obersztyn, E., Nowakowska, B., Rosengren, S. S., Bader, P. I., Grange, D. K., Naqvi, S., Garnica, A. D., Bernes, S. M., Fong, C. T., Summers, A., Walters, W. D., Lupski, J. R., Stankiewicz, P., Cheung, S. W., and Patel, A. (2008). Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet* **40**(12), 1466-71.
- Cejtin, H. E., Kalinowski, A., Bacchetti, P., Taylor, R. N., Watts, D. H., Kim, S., Massad, L. S., Preston-Martin, S., Anastos, K., Moxley, M., and Minkoff, H. L. (2006). Effects of human immunodeficiency virus on protracted amenorrhea and ovarian dysfunction. *Obstet Gynecol* **108**(6), 1423-31.
- Chand, A. L., Harrison, C. A., and Shelling, A. N. (2010). Inhibin and premature ovarian failure. *Hum Reprod Update* **16**(1), 39-50.
- Clowse, M. E., Behera, M. A., Anders, C. K., Copland, S., Coffman, C. J., Leppert, P. C., and Bastian, L. A. (2009). Ovarian preservation by GnRH agonists during chemotherapy: a meta-analysis. *J Womens Health (Larchmt)* **18**(3), 311-9.
- Colella, S., Yau, C., Taylor, J. M., Mirza, G., Butler, H., Clouston, P., Bassett, A. S., Seller, A., Holmes, C. C., and Ragoussis, J. (2007). QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-

- Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res* **35**(6), 2013-25.
- Cordts, E. B., Christofolini, D. M., Dos Santos, A. A., Bianco, B., and Barbosa, C. P. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet* **283**(3), 635-43.
- D'Haene, B., Vandesompele, J., and Hellemans, J. (2010). Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* **50**(4), 262-70.
- Davis, C. J., Davison, R. M., Payne, N. N., Rodeck, C. H., and Conway, G. S. (2000). Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: opinion. *Hum Reprod* **15**(11), 2418-22.
- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P., and Persani, L. (2004). Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* **75**(1), 106-11.
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., and Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* **383**(6600), 531-5.
- Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Leheup, B., and Jouvet, P. (2006). Pathophysiology of impaired ovarian function in galactosaemia. *Hum Reprod Update* **12**(5), 573-84.
- Gleicher, N., Weghofer, A., Kim, A., and Barad, D. H. (2012). The impact in older women of ovarian FMR1 genotypes and sub-genotypes on ovarian reserve. *PLoS One* **7**(3), e33638.
- Gleicher, N., Weghofer, A., Lee, I. H., and Barad, D. H. (2011). Association of FMR1 genotypes with in vitro fertilization (IVF) outcomes based on ethnicity/race. *PLoS One* **6**(4), e18781.
- Goswami, D., and Conway, G. S. (2005). Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update* **11**(4), 391-410.
- Goswami, R., Goswami, D., Kabra, M., Gupta, N., Dubey, S., and Dadhwal, V. (2003). Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. *Fertil Steril* **80**(4), 1052-4.
- Gubbels, C. S., Thomas, C. M., Wodzig, W. K., Olthaar, A. J., Jaeken, J., Sweep, F. C., and Rubio-Gozalbo, M. E. (2011). FSH isoform pattern in classic galactosemia. *J Inherit Metab Dis* **34**(2), 387-90.
- Hanna, C. W., Bretherick, K. L., Gair, J. L., Fluker, M. R., Stephenson, M. D., and Robinson, W. P. (2009). Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod* **24**(5), 1206-11.
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., and Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* **70**(4), 900-9.
- Inagaki, K., and Shimasaki, S. (2010). Impaired production of BMP-15 and GDF-9 mature proteins derived from proproteins WITH mutations in the proregion. *Mol Cell Endocrinol* **328**(1-2), 1-7.
- Jacobs, P. A., Baikie, A. G., Brown, W. M., Macgregor, T. N., Maclean, N., and Harnden, D. G. (1959). Evidence for the existence of the human "super female". *Lancet* **2**(7100), 423-5.
- Jin, M., Yu, Y., and Huang, H. (2012). An update on primary ovarian insufficiency. *Sci China Life Sci* **55**(8), 677-86.
- Kappeler, C. J., and Hoyer, P. B. (2012). 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. *Syst Biol Reprod Med* **58**(1), 57-62.

- Kearney, H. M., Kearney, J. B., and Conlin, L. K. (2011). Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med* **31**(4), 595-613, ix.
- Klein, P., Serje, A., and Pezzullo, J. C. (2001). Premature ovarian failure in women with epilepsy. *Epilepsia* **42**(12), 1584-9.
- Konishi, H., Mohseni, M., Tamaki, A., Garay, J. P., Croessmann, S., Karnan, S., Ota, A., Wong, H. Y., Konishi, Y., Karakas, B., Tahir, K., Abukhdeir, A. M., Gustin, J. P., Cidado, J., Wang, G. M., Cosgrove, D., Cochran, R., Jelovac, D., Higgins, M. J., Arena, S., Hawkins, L., Luring, J., Gross, A. L., Heaphy, C. M., Hosokawa, Y., Gabrielson, E., Meeker, A. K., Visvanathan, K., Argani, P., Bachman, K. E., and Park, B. H. (2011). Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(43), 17773-8.
- La Marca, A., Brozzetti, A., Sighinolfi, G., Marzotti, S., Volpe, A., and Falorni, A. (2010). Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes. *Curr Opin Obstet Gynecol* **22**(4), 277-82.
- Latronico, A. C., Chai, Y., Arnhold, I. J., Liu, X., Mendonca, B. B., and Segaloff, D. L. (1998). A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Mol Endocrinol* **12**(3), 442-50.
- Lin, H. J., Ndiforchu, F., and Patell, S. (1993). Exstrophy of the cloaca in a 47,XXX child: review of genitourinary malformations in triple-X patients. *Am J Med Genet* **45**(6), 761-3.
- Lin, W. T., Beattie, M., Chen, L. M., Oktay, K., Crawford, S. L., Gold, E. B., Cedars, M., and Rosen, M. (2013). Comparison of age at natural menopause in BRCA1/2 mutation carriers with a non-clinic-based sample of women in northern California. *Cancer* **119**(9), 1652-9.
- Lofrano-Porto, A., Barra, G. B., Giacomini, L. A., Nascimento, P. P., Latronico, A. C., Casulari, L. A., and da Rocha Neves Fde, A. (2007). Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women. *N Engl J Med* **357**(9), 897-904.
- Mandon-Pepin, B., Touraine, P., Kuttann, F., Derbois, C., Rouxel, A., Matsuda, F., Nicolas, A., Cotinot, C., and Fellous, M. (2008). Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* **158**(1), 107-15.
- Matikainen, T., Perez, G. I., Jurisicova, A., Pru, J. K., Schlezinger, J. J., Ryu, H. Y., Laine, J., Sakai, T., Korsmeyer, S. J., Casper, R. F., Sherr, D. H., and Tilly, J. L. (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* **28**(4), 355-60.
- Matthews, C. H., Borgato, S., Beck-Peccoz, P., Adams, M., Tone, Y., Gambino, G., Casagrande, S., Tedeschini, G., Benedetti, A., and Chatterjee, V. K. (1993). Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet* **5**(1), 83-6.
- McPherson, J. P., Hande, M. P., Poonepalli, A., Lemmers, B., Zablocki, E., Migon, E., Shehabeldin, A., Porras, A., Karaskova, J., Vukovic, B., Squire, J., and Hakem, R. (2006). A role for Brca1 in chromosome end maintenance. *Hum Mol Genet* **15**(6), 831-8.
- Mefford, H. C., Sharp, A. J., Baker, C., Itsara, A., Jiang, Z., Buysse, K., Huang, S., Maloney, V. K., Crolla, J. A., Baralle, D., Collins, A., Mercer, C., Norga, K., de Ravel, T.,

- Devriendt, K., Bongers, E. M., de Leeuw, N., Reardon, W., Gimelli, S., Bena, F., Hennekam, R. C., Male, A., Gaunt, L., Clayton-Smith, J., Simonic, I., Park, S. M., Mehta, S. G., Nik-Zainal, S., Woods, C. G., Firth, H. V., Parkin, G., Fichera, M., Reitano, S., Lo Giudice, M., Li, K. E., Casuga, I., Broomer, A., Conrad, B., Schwerzmann, M., Raber, L., Gallati, S., Striano, P., Coppola, A., Tolmie, J. L., Tobias, E. S., Lilley, C., Armengol, L., Spysschaert, Y., Verloo, P., De Coene, A., Goossens, L., Mortier, G., Speleman, F., van Binsbergen, E., Nelen, M. R., Hochstenbach, R., Poot, M., Gallagher, L., Gill, M., McClellan, J., King, M. C., Regan, R., Skinner, C., Stevenson, R. E., Antonarakis, S. E., Chen, C., Estivill, X., Menten, B., Gimelli, G., Gribble, S., Schwartz, S., Sutcliffe, J. S., Walsh, T., Knight, S. J., Sebat, J., Romano, C., Schwartz, C. E., Veltman, J. A., de Vries, B. B., Vermeesch, J. R., Barber, J. C., Willatt, L., Tassabehji, M., and Eichler, E. E. (2008). Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* **359**(16), 1685-99.
- Morrison, J. C., Givens, J. R., Wiser, W. L., and Fish, S. A. (1975). Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril* **26**(7), 655-9.
- Nelis, M., Esko, T., Magi, R., Zimprich, F., Zimprich, A., Toncheva, D., Karachanak, S., Piskackova, T., Balascak, I., Peltonen, L., Jakkula, E., Rehnstrom, K., Lathrop, M., Heath, S., Galan, P., Schreiber, S., Meitinger, T., Pfeufer, A., Wichmann, H. E., Melegh, B., Polgar, N., Toniolo, D., Gasparini, P., D'Adamo, P., Klovins, J., Nikitina-Zake, L., Kucinskas, V., Kasnauskiene, J., Lubinski, J., Debniak, T., Limborska, S., Khrunin, A., Estivill, X., Rabionet, R., Marsal, S., Julia, A., Antonarakis, S. E., Deutsch, S., Borel, C., Attar, H., Gagnebin, M., Macek, M., Krawczak, M., Remm, M., and Metspalu, A. (2009). Genetic structure of Europeans: a view from the North-East. *PLoS One* **4**(5), e5472.
- Nicol, L., Bishop, S. C., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L. E., Rhind, S. M., and McNeilly, A. S. (2009). Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction* **138**(6), 921-33.
- Nodin, B., Fridberg, M., Uhlen, M., and Jirstrom, K. (2012). Discovery of dachshund 2 protein as a novel biomarker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* **5**(1), 6.
- Ohl, J., Partisani, M., Demangeat, C., Binder-Foucard, F., Nisand, I., and Lang, J. M. (2010). [Alterations of ovarian reserve tests in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected women]. *Gynecol Obstet Fertil* **38**(5), 313-7.
- Oktay, K., Kim, J. Y., Barad, D., and Babayev, S. N. (2010). Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* **28**(2), 240-4.
- Otsuka, F., McTavish, K. J., and Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* **78**(1), 9-21.
- Palmer, J. S., Zhao, Z. Z., Hoekstra, C., Hayward, N. K., Webb, P. M., Whiteman, D. C., Martin, N. G., Boomsma, D. I., Duffy, D. L., and Montgomery, G. W. (2006). Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(11), 4713-6.
- Pan, H., Ma, P., Zhu, W., and Schultz, R. M. (2008). Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol* **316**(2), 397-407.
- Persani, L., Rossetti, R., and Cacciatore, C. (2010). Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol* **45**(5), 257-79.
- Petraglia, F., Hartmann, B., Luisi, S., Florio, P., Kirchengast, S., Santuz, M., Genazzani, A. D., and Genazzani, A. R. (1998). Low levels of serum inhibin A and inhibin B in

- women with hypergonadotropic amenorrhea and evidence of high levels of activin A in women with hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril* **70**(5), 907-12.
- Pisarska, M. D., Kuo, F. T., Bentsi-Barnes, I. K., Khan, S., and Barlow, G. M. (2010). LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(1), E101-9.
- Prueitt, R. L., Chen, H., Barnes, R. I., and Zinn, A. R. (2002). Most X;autosome translocations associated with premature ovarian failure do not interrupt X-linked genes. *Cytogenet Genome Res* **97**(1-2), 32-8.
- Quilter, C. R., Karcianas, A. C., Bagga, M. R., Duncan, S., Murray, A., Conway, G. S., Sargent, C. A., and Affara, N. A. (2010). Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF). *Hum Reprod* **25**(8), 2139-50.
- Rennstam, K., Ringberg, A., Cunliffe, H. E., Olsson, H., Landberg, G., and Hedenfalk, I. (2010). Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from BRCA1 mutation carriers may be caused by BRCA1 haploinsufficiency. *Genes Chromosomes Cancer* **49**(1), 78-90.
- Rizzolio, F., Bione, S., Sala, C., Goegan, M., Gentile, M., Gregato, G., Rossi, E., Pramparo, T., Zuffardi, O., and Toniolo, D. (2006). Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature. *Hum Reprod* **21**(6), 1477-83.
- Rizzolio, F., Pramparo, T., Sala, C., Zuffardi, O., De Santis, L., Rabbellotti, E., Calzi, F., Fusi, F., Bellazzi, R., and Toniolo, D. (2009). Epigenetic analysis of the critical region I for premature ovarian failure: demonstration of a highly heterochromatic domain on the long arm of the mammalian X chromosome. *J Med Genet* **46**(9), 585-92.
- Rossetti, R., Di Pasquale, E., Marozzi, A., Bione, S., Toniolo, D., Grammatico, P., Nelson, L. M., Beck-Peccoz, P., and Persani, L. (2009). BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat* **30**(5), 804-10.
- Rubio-Gozalbo, M. E., Gubbels, C. S., Bakker, J. A., Menheere, P. P., Wodzig, W. K., and Land, J. A. (2010). Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Hum Reprod Update* **16**(2), 177-88.
- Schuh-Huerta, S. M., Johnson, N. A., Rosen, M. P., Sternfeld, B., Cedars, M. I., and Reijo Pera, R. A. (2012). Genetic variants and environmental factors associated with hormonal markers of ovarian reserve in Caucasian and African American women. *Hum Reprod* **27**(2), 594-608.
- Sharara, F. I., Seifer, D. B., and Flaws, J. A. (1998). Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril* **70**(4), 613-22.
- Simpson, J. L. (2008). Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci* **1135**, 146-54.
- Simpson, J. L., and Rajkovic, A. (1999). Ovarian differentiation and gonadal failure. *Am J Med Genet* **89**(4), 186-200.
- Soules, M. R., Battaglia, D. E., and Klein, N. A. (1998). Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas* **30**(2), 193-204.
- Tartaglia, N. R., Howell, S., Sutherland, A., Wilson, R., and Wilson, L. (2010). A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis* **5**, 8.
- Tea, M. K., Weghofer, A., Wagner, K., and Singer, C. F. (2013). Association of BRCA1/2 mutations with FMR1 genotypes: Effects on menarcheal and menopausal age. *Maturitas*.

- Testa, G., Chiaffarino, F., Vegetti, W., Nicolosi, A., Caliari, I., Alagna, F., Bolis, P. F., Parazzini, F., and Crosignani, P. G. (2001). Case-control study on risk factors for premature ovarian failure. *Gynecol Obstet Invest* **51**(1), 40-3.
- Wang, B., Wen, Q., Ni, F., Zhou, S., Wang, J., Cao, Y., and Ma, X. (2010). Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* **72**(1), 135-6.
- Wang, K., Chen, Z., Tadesse, M. G., Glessner, J., Grant, S. F., Hakonarson, H., Bucan, M., and Li, M. (2008). Modeling genetic inheritance of copy number variations. *Nucleic Acids Res* **36**(21), e138.
- Welt, C. K. (2008). Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* **68**(4), 499-509.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J., and Matzuk, M. M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* **15**(6), 854-66.
- Zinn, A. R., Tonk, V. S., Chen, Z., Flejter, W. L., Gardner, H. A., Guerra, R., Kushner, H., Schwartz, S., Sybert, V. P., Van Dyke, D. L., and Ross, J. L. (1998). Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. *Am J Hum Genet* **63**(6), 1757-66.

## Kasutatatud veebiaadressid

- <sup>1</sup> <http://www.omim.org/>
- <sup>2</sup> [http://www.illumina.com/products/humancytosnp\\_12\\_dna\\_analysis\\_beadchip\\_kits.ilmn](http://www.illumina.com/products/humancytosnp_12_dna_analysis_beadchip_kits.ilmn)
- <sup>3</sup> <http://projects.tcag.ca/variation/>
- <sup>4</sup> <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- <sup>5</sup> <http://bioinfo.ut.ee/gwRTqPCR>
- <sup>6</sup> <http://primer3.wi.mit.edu/>
- <sup>7</sup> <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- <sup>8</sup> [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)
- <sup>9</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- <sup>10</sup> <https://decipher.sanger.ac.uk/syndrome/62>

# LISAD

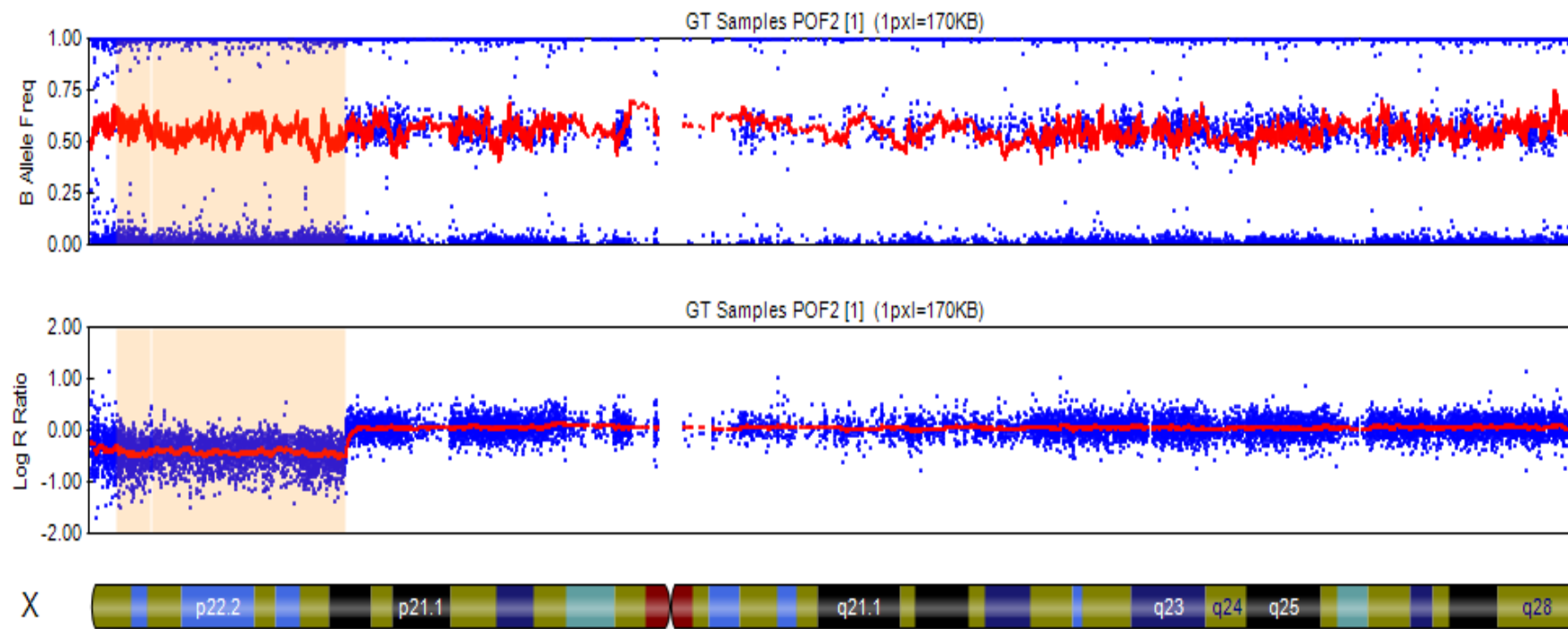
## LISA 1. Töös RT-qPCR-ks kasutatud praimerite järjestused

<b>Praimerid</b>	<b>Kromosoom</b>	<b>Forward praimer</b>	<b>Reverse praimer</b>
POF20_1_1	1q21.1-q21.2	TGCCATTTTGAGCCACACGA	TCAGCAGTGAACACGAAAGCCA
POF20_1_2	1q21.1-q21.2	TTCCTGGGTGAGGCGTTTCATA	AACATTTGTTCCCATGCTCCCC
POF20_1_3	1q21.1-q21.2	TCTTTATGGGCCTGTGCCTTCA	TTCCATTGCTGGGTTCATGCTC
POF20_1_4	1q21.1-q21.2	TGGGTTAATCGCAGGATCAGCA	TTTCCAGGGCGTGTGCTTTT
POF20_1_5	1q21.1-q21.2	TTTGAATGGCGCAGTGGGAA	TCTTGCCTGCACCGTGAGTTTT
B1237_17_1	17q21.31	TCAATGTTCAATGTGCCAGCA	CATTCCCAGCAATCTCCGACAA
B1237_17_2	17q21.31	TTGCCGAAGTCAAAGAGGACCA	TTCCTGATTCTGAGGCCATGA
B1237_17_3	17q21.31	TTTGCCTGCTGCACATGGATT	AGCTGGTGATGCTGGGAAAATG
B1237_17_4	17q21.31	ATGCCCCGCCATGCAATTAT	AAAACCTCGTTTCTGCTTGGGC
B1237_17_5	17q21.31	CGCTGCAACTTGCTGTGTCTTTT	CAAATCCAGGTGTCCCAAAGCA
B1237_17_6	17q21.31	TCAAGGTGGGAAGTGCCTCTTTT	TTGTGGTAGGCAGCTTTGGGAA
B1237_17_7	17q21.31	CCCCGGATGACGTAAAAGGAAA	TGCAATAAGCCGCAACTGGAA
B1237_17_8	17q21.31	TCCATGCTTTAAGAGCTTCCCCA	TTTTACTTCCCAAGCCACCCCA
B1240_X_1	Xp22.31	TGGGGAACTGGTAAATTTGGGG	AATGAATGGTTTGGGGAGGCA
B1240_X_2	Xp22.31	TGCCAATTTAAGAACCACCTGCC	TGCATAAAGGTGTCATGTTCCGCC
B1240_X_3	Xp22.31	ACGCAGAAATCAAGGAGCATGTG	AATCGAGAAACAACCCTCAGCCA
B1240_X_4	Xp22.31	AACTGTGCTGATGTTTGCCCA	CACCCAATTCGCCATTTCATCA
B1240_X_5	Xp22.31	TGTTGGGGTTCTTTGGGAATGC	TGCAAAATATTCGGGAAGTGGGG
B1240_X_6	Xp22.31	CCAAATCTCCAAATGCCAGCCT	ATTTTCCCTCCCCTGCCCATAA
B1240_X_7	Xp22.31	TGGGACGTGGAATGAAGTGGAA	TGGCAGCATTTGGGGTTTCA
B1240_X_8	Xp22.31	TGTTCTGTGCCCATGAAGCAAAT	CCTTCATGCAAAGGGTGTGGA
<b>Referents-praimerid</b>	<b>Kromosoom</b>	<b>Forward praimer</b>	<b>Reverse praimer</b>
Ref17	1p35.3	TGCGAAACTGCGTGGACATT	ATGCGGAAGCCCATTTCAT
ZNF80	3q13.3	CTGTGACCTGCAGCTCATCCT	TAAGTTCTCTGACGTTGACTGATGTG



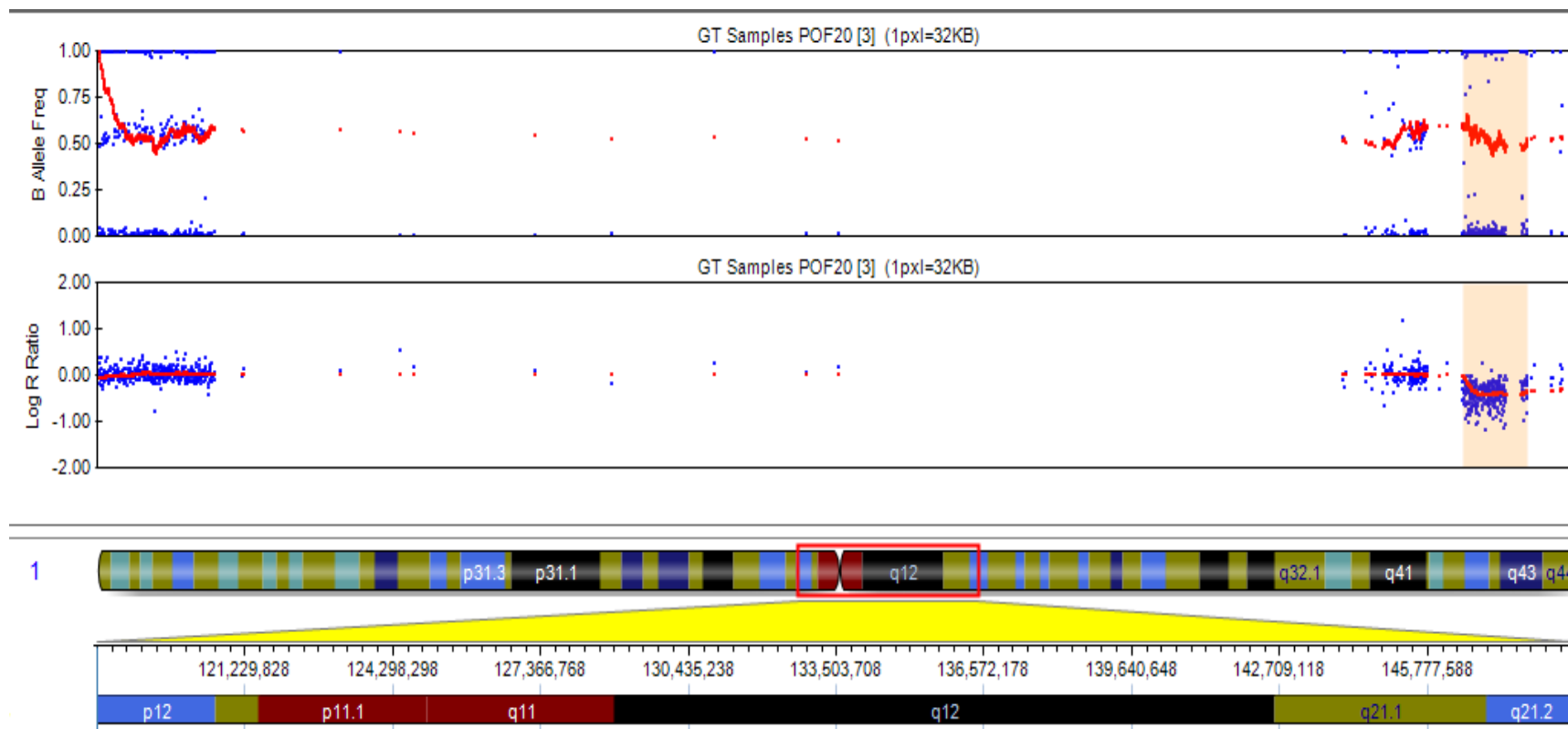
## LISA 2. Töös PCR-ks ja sekveneerimiseks kasutatud praimerite järjestused

Praimeri nimi	Järjestus 5' -> 3'
DACH2-exon_1F	GTTTGTGAGCTTGAGCGTG
DACH2-exon_1R	GAAACGAGTGTCTCACCTGG
DACH2-exon_2F	CCCTTATGGCGCTAATGTTTGCCA
DACH2-exon_2R	TGCTGGGCAGTACGAAGAGACA
DACH2-exon_3F	AGCCTGCACTTGTACCCCA
DACH2-exon_3R	TCCCACCTCTCTCCTGCCCC
DACH2-exon_4F	GGCCTTCCCAGAGGCAGCTT
DACH2-exon_4R	ACACACCCAGTTTTGTGAGGACAG
DACH2-exon_5F	GGCACAAGGAGACACTAAGAT
DACH2-exon_5R	TTTGCATGAAATTGACACCTTTG
DACH2-exon_6F	TCCTTTTGTGTTTCCTTTTGTGT
DACH2-exon_6R	CCAGCTTTTCCCTCTCCTCT
DACH2-exon_7F	AGATGCTTAGTAGAGGTGGCT
DACH2-exon_7R	GGTACAGGAAATGACATGCAGT
DACH2-exon_8F	ACTGCATGTCATTTCTGTACC
DACH2-exon_8R	CTCCTGACCTCGTGATCCTC
DACH2-exon_9F	ACTGGCATCCCTATTTTATTGC
DACH2-exon_9R	TGCTTTGTTTACCTTGAGTGTGA
DACH2-exon_10F	CCCTTTAAATGGAATCAGGAACC
DACH2-exon_10R	CAGAAGCTCATCCCCACCTC
MSH5_2F	CCTCTGTGAATCGTTGCTTC
MSH5_2R	GGCTCCCAACCCTCTTTTAT
BMP15_1Fb	TTTTCTTGCCCCATCCTTGG
BMP15_1Rb	TCCACTTCTCTCCCTTCCAG
BMP15_2Fb	AAACCTCTGCTCTTGTTCCC
BMP15_2Rb	CTAGCCGTAAGTTGCTGTC



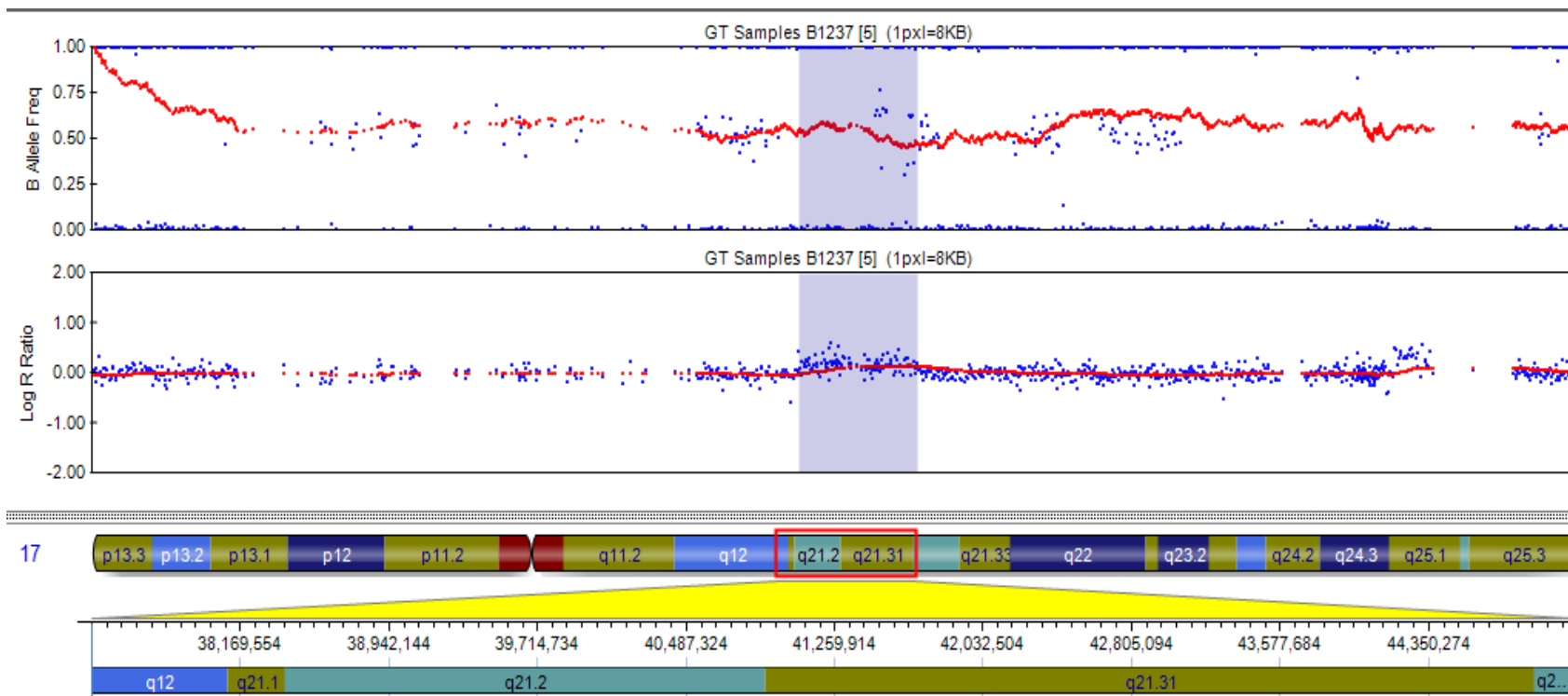
### LISA 3. Patsiendil POF2 leitud 24,07 Mb suurune deletsioon

Pilt on saadud patsiendi POF2 genotüpiseerimistulemuste analüüsil programmiga GenomeStudio versioon 2011.1 (Illumina Inc.). Pildil on toodud deletsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina vastavalt alleelide intensiivsuse suhet (*B Allele Frequency*) (üleval) ja normaliseeritud signaaliintensiivsusi (*logR ratio*) (all). Graafiku X-teljel paiknevad HumanCytoSNP-12 kogu genoomi BeadChip mikrokiibi X-kromosoomil leiduvad SNP proovid. Y-teljel on SNP-idele vastavad signaaliintensiivsused. Roosa värviga on tähistatud deletsioon.



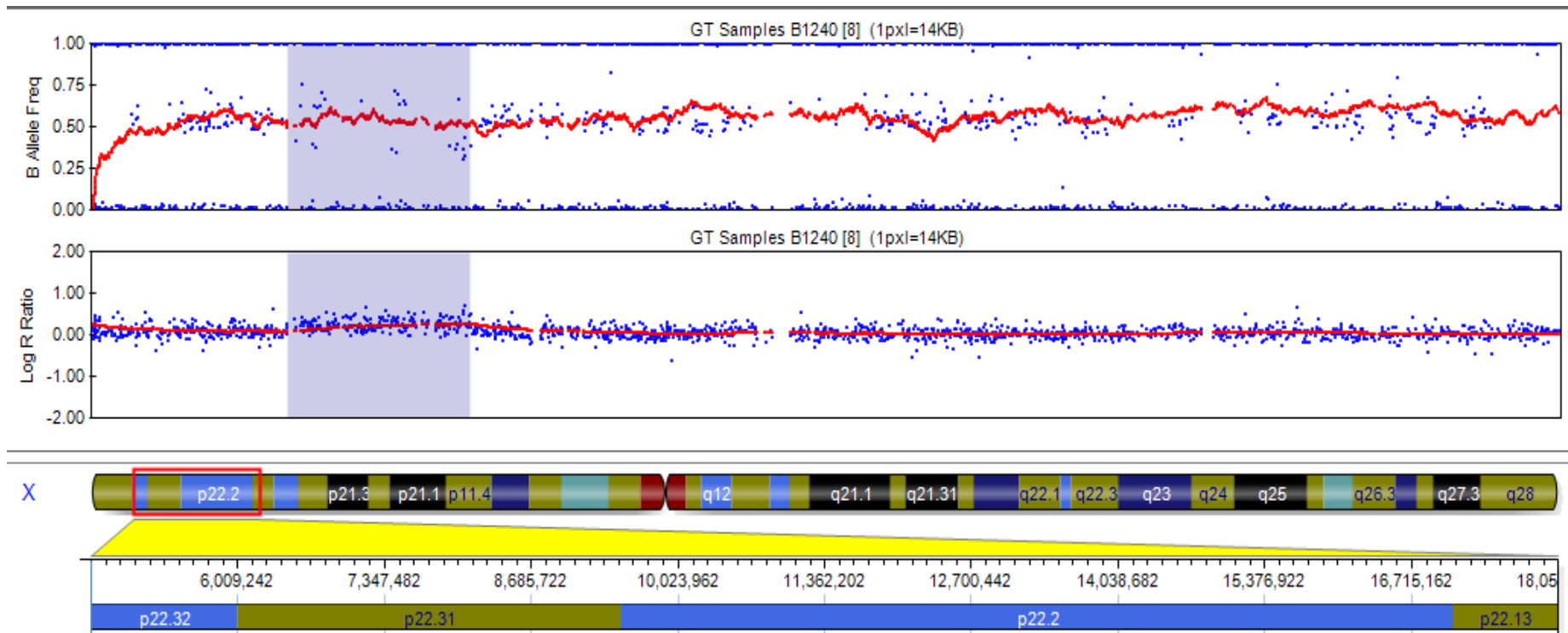
#### LISA 4. Patsiendil POF20 leitud 1,35 Mb suurune deletsioon

Pilt on saadud patsiendi POF20 genotüpiseerimistulemuste analüüsil programmiga GenomeStudio versioon 2011.1 (Illumina Inc.). Pildil on toodud deletsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina vastavalt alleelide intensiivsuse suhet (*B Allele Frequency*) (üleväl) ja normaliseeritud signaaliintensiivsusi (*logR ratio*) (all). Graafiku X-teljel paiknevad HumanCytoSNP-12 kogu genoomi BeadChip mikrokiibi 1.-kromosoomil leiduvad SNP proovid. Y-teljel on SNP-idele vastavad signaaliintensiivsused. Roosa värviga on tähistatud deletsioon.



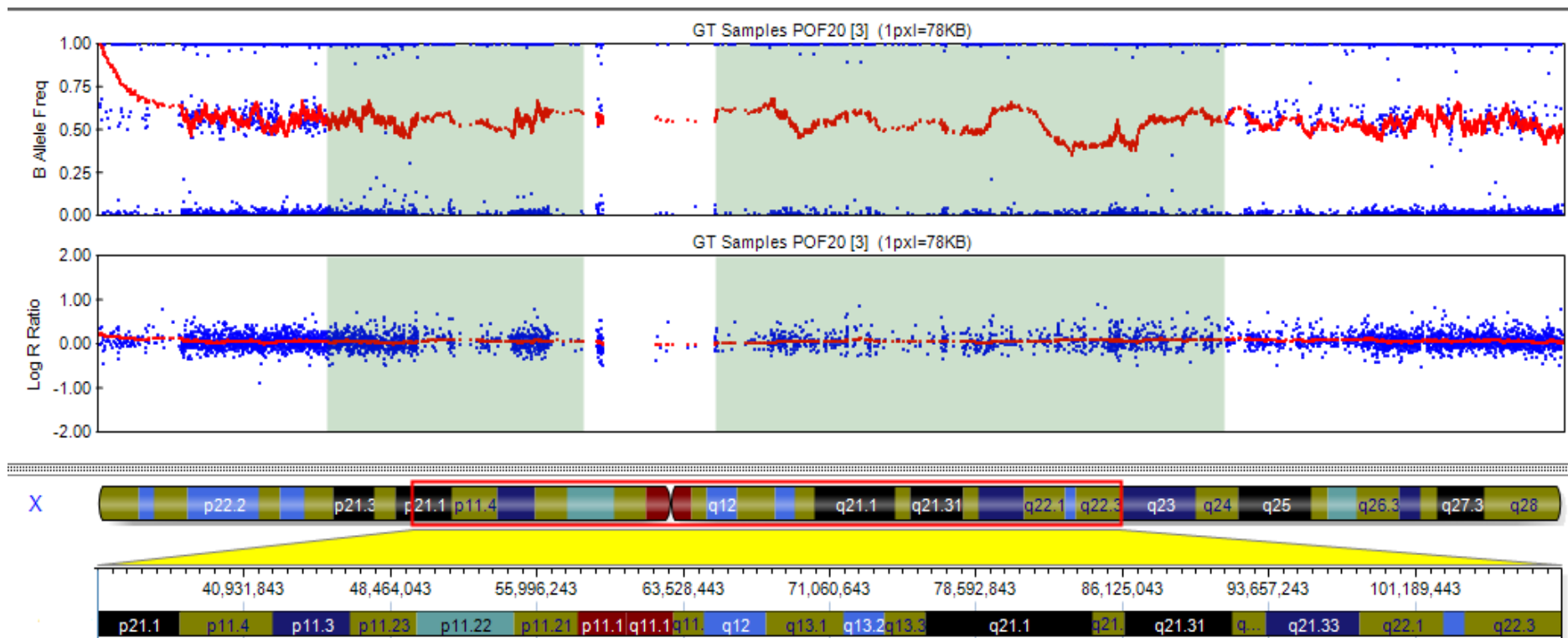
### LISA 5. Patsiendil B1237 leitud 78 kb suurune duplikatsioon

Pilt on saadud patsiendi B1237 genotüpiseerimistulemuste analüüsil programmiga GenomeStudio versioon 2011.1 (Illumina Inc.). Pildil on toodud duplikatsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina vastavalt alleelide intensiivsuse suhet (*B Allele Frequency*) (üleval) ja normaliseeritud signaaliintensiivsusi (*logR ratio*) (all). Graafiku X-teljel paiknevad HumanCytoSNP-12 kogu genoomi BeadChip mikrokiibi 17.-kromosoomil leiduvad SNP proovid. Y-teljel on SNP-idele vastavad signaaliintensiivsused. Sinise värviga on tähistatud duplikatsioon.



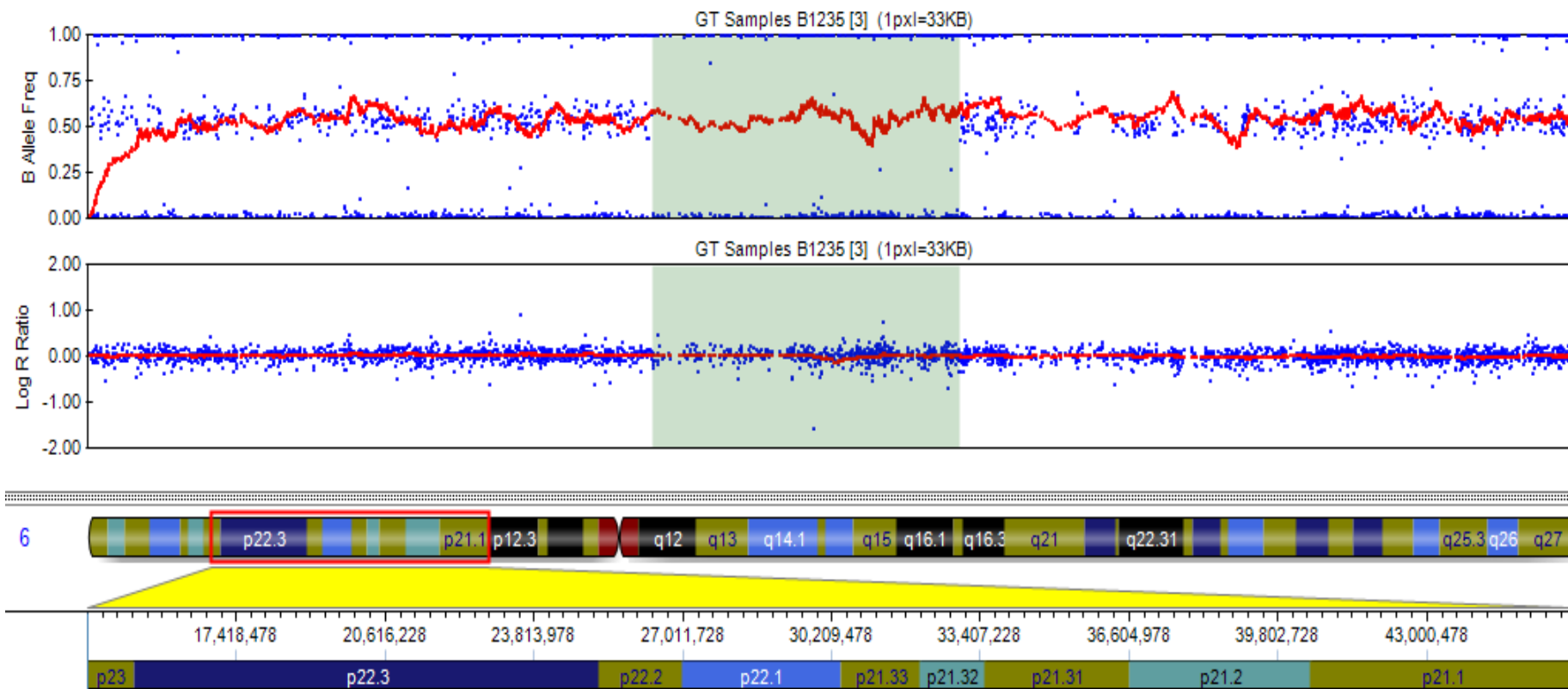
#### LISA 6. Patsiendil B1240 leitud 1,2 Mb suurune duplikatsioon

Pilt on saadud patsiendi B1240 genotüpiseerimistulemuste analüüsil programmiga GenomeStudio versioon 2011.1 (Illumina Inc.). Pildil on toodud duplikatsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina vastavalt alleelide intensiivsuse suhet (*B Allele Frequency*) (üleväl) ja normaliseeritud signaaliintensiivsusi (*logR ratio*) (all). Graafiku X-teljel paiknevad HumanCytoSNP-12 kogu genoomi BeadChip mikrokiibi X-kromosoomil leiduvad SNP proovid. Y-teljel on SNP-idele vastavad signaaliintensiivsused. Sinise värviga on tähistatud duplikatsioon.



### LISA 7. Patsiendil POF20 leitud 13,24 Mb ja 29 Mb pikkused LOH alad

Pilt on saadud patsiendi POF20 genotüpiseerimistulemuste analüüsil programmiga GenomeStudio versioon 2011.1 (Illumina Inc.). Pildil on toodud LOH alade detekteerimine, kasutades parameetrina vastavalt alleelide intensiivsuse suhet (*B Allele Frequency*) (üleväl) ja normaliseeritud signaaliintensiivsusi (*logR ratio*) (all). Graafiku X-teljel paiknevad HumanCytoSNP-12 kogu genoomi BeadChip mikrokiibi X-kromosoomil leiduvad SNP proovid. Y-teljel on SNP-idele vastavad signaaliintensiivsused. Roheka värviga on tähistatud LOH alad.



#### LISA 8. Patsiendil B1235 leitud 6,6 Mb suurune LOH ala

Pilt on saadud patsiendi B1235 genotüpiseerimistulemuste analüüsil programmiga GenomeStudio versioon 2011.1 (Illumina Inc.). Pildil on toodud LOH ala detekteerimine, kasutades parameetrina vastavalt alleelide intensiivsuse suhet (*B Allele Frequency*) (üleväl) ja normaliseeritud signaaliintensiivsusi (*logR ratio*) (all). Graafiku X-teljel paiknevad HumanCytoSNP-12 kogu genoomi BeadChip mikrokiibi 6.-kromosoomil leiduvad SNP proovid. Y-teljel on SNP-idele vastavad signaaliintensiivsused. Roheka värviga on tähistatud LOH ala.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kati Hiieleek (sünnikuupäev: 06.05.1988),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose DNA koopiaarvu muutused primaarse munasarjade puudulikkusega naistel, mille juhendaja on prof.Ants Kurg, Ph.D,
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013